



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Daniel Alexandre

**Estudo da digestão de proteínas com ênfase na distribuição
espacial das proteinases digestivas do camarão branco do
Pacífico *Litopenaeus vannamei***

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do grau em doutor em
bioquímica.

Orientador: Dr. Carlos Peres Silva

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Alexandre, Daniel

Estudo da digestão de proteínas com ênfase na distribuição especial das proteinases digestivas do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* : Estudo da digestão de proteínas com ênfase na distribuição especial das proteinases digestivas do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* / Daniel Alexandre ; orientador, Carlos Peres Silva - Florianópolis, SC, 2014.
68 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

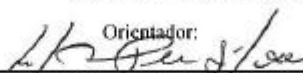
1. Bioquímica. 2. A presente tese relata estudos sobre a digestão de proteínas no camarão branco do pacífico *Litopenaeus vannamei*, com ênfase na distribuição das proteinases e com a identificação da membrana peritrófica na espécie, fundamentar a circulação endo ectoperitrófica.. I. Silva, Carlos Peres. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Estudo da digestão de proteínas com ênfase na distribuição espacial das
proteínas digestivas do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei*,"
por

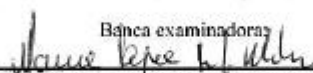
Daniel Alexandre

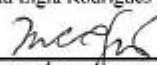
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos
membros titulares da Banca Examinadora (Port.
27/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica - UFSC, composta
pelos Professores Doutores:

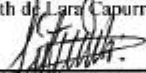
Orientador:

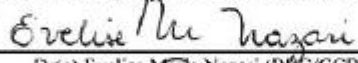

Dr(a) Carlos Peres Silva (Orientador/BQA/CCB/UFSC)

Banca examinadora:


Dr(a) Maria Lígia Rodrigues Macedo (UFMS)

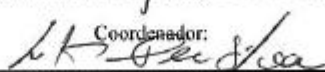

Dr(a) Margareth de Lara Capurro-Guimarães (USP)


Dr(a) Fatima Regina Mera Barreto Silva (BQA/CCB/UFSC)


Dr(a) Evelise Maria Nazari (BQA/CCB/UFSC)


Dr(a) Aleir Luiz Daffe (BQA/CCB/UFSC)

Coordenador:


Dr. Carlos Peres Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 18 de setembro de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram nesta trajetória, em especial quero agradecer ao professor Dr. Calos Peres Silva que me orientou por seis anos que não apenas formaram uma pessoa, mais sim construiu um homem de bem. Se existe um exemplo de pessoa íntegra, honesta e super inteligente este é o professor Carlos Peres. Agradeço a todos os alunos do laboratório de bioquímica e biologia molecular de insetos, Daniela Mineira, Daniele Kunz, Gabriel Oliveira, Jennifer Silveira, Michelle Santana e Ricardo Linhares, que sempre estiveram ao meu lado mesmo que eu não demonstrasse a sua importância na minha trajetória. Agradeço à Simone e ao Batista que foram meus pais emprestados. Agradeço aos meus pais Genico e Ivete, que mesmo de longe, me apoiaram e me incentivaram a nunca desistir, mesmo quando forças me faltaram. Agradeço a minha esposa Alana que segurou a barra de um namoro à distância e que conseguiu me levar até um altar. A todos gostaria de dizer que se me faltam palavras para demonstrar como cada um é importante na minha vida, me sobra em entusiasmo e energia para demonstrar.

Um grande abraço em todos.

RESUMO

Os camarões possuem importância econômica, distribuídos por todo tropical e subtropical em todas as regiões do mundo. Por causa da pressão contínua sobre os estoques pesqueiros de camarões para consumo humano, a carcinicultura em muitos países se desenvolveu como uma importante ferramenta para suprir fonte de proteína de crustáceos. A espécie *Litopenaeus vannamei* ou camarão branco do Pacífico é uma espécie oriunda do pacífico que foi introduzida com maior sucesso nas fazendas de cultivo devido suportarem grande variação de salinidade. Possui intestino anterior e posterior de origem ectodérmica e intestino médio de origem endodérmica o que faz esta região uma região de secreção e absorção de nutrientes. No intestino médio dos peneídeos, assim como em insetos, ocorre a presença da membrana peritrófica, sendo que nos insetos lhe foi aferida uma função fisiológica importante: a circulação endo ectoperitrófica. Na presente tese, através do conhecimento da bioquímica da digestão de proteínas e pelo conhecimento do comportamento das enzimas ao longo do intestino médio do camarão, foi possível identificar o mesmo padrão de decréscimo de atividade ao logo deste, que foi desfeito, ao ser suplementado a dieta com proteínas (ovoalbumina nas concentrações de 60% e 80% m/m). Estas atividades enzimáticas foram observadas através de reação de digestão com substratos sintéticos (suc-AAPF-pNA, bz-R-pNA e L-pNA), substrato proteico (Azoalbumina) e zimograma em SDS-PAGE 12% contendo 0,1% de gelatina. Na tentativa de purificar e identificar algumas enzimas foi utilizado cromatografia de troca iônica em coluna do tipo Mono – Q. Em outros experimentos que corroboram a hipótese de circulação endo ectoperitrófica em camarões foi utilizado o processo de gavagem que através de filmagens foi possível visualizar o processo acontecendo, fundamentando assim a circulação endo ectoperitrófica em camarões.

Palavras Chave: Camarão branco do Pacífico, proteinases, membrana peritrófica e circulação endo ectoperitrófica.

ABSTRACT

Prawns and shrimps have economic importance, distributed throughout tropical and subtropical regions in the world. Because of continued pressure on fish stocks of shrimps for human consumption, shrimp farming in many countries has developed as an important tool to meet protein source crustaceans. The *Litopenaeus vannamei* species or Pacific white shrimp is a species from Pacific which was introduced more successfully in cultivation farms due withstand large variations in salinity. Shrimps have anterior and posterior intestine from ectodermal and endodermal origin, which it makes this region a region of secretion and absorption of nutrients. The midgut of penaeids, as in insects, the presence of the peritrophic membrane occurs, and it was measured in insects an important physiological function: the endo ectoperitrophic circulation. In this thesis, through the knowledge of the biochemistry of protein digestion and knowledge of the behavior of the enzymes along the midgut of juvenile shrimp, it was possible to identify the same pattern of decrease of the enzyme activities, which were shifted, when the diet was supplemented with a protein (ovalbumin at the concentrations of 60% and 80% w / w). These enzyme activities were assessed by digestion reaction with synthetic substrates (suc-AAPF-pNA, bz-R-L-pNA and pNA) protein substrate (azovalbumina) and zymogram on SDS-12% PAGE containing 0.1% gelatin. In an attempt to purify and identify some enzymes it was used ion-exchange chromatography on Mono-type column - Q. Other experiments support the hypothesis that the endo ectoperitrophic circulation takes place in shrimps by using the gavage process, through which it was possible to document the process.

Keywords: Pacific white shrimp, proteinases, peritrophic membrane and endo ectoperitrophic circulation.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura /Tabela	Página
Figura 1- Imagens dos experimentos registrados	29
Figura 2- pH <i>In vivo</i> no camarão branco	35
Figura 3- pH ótimo para o estudo das proteinases	36
Figura 4- Microscopia de luz e fluorescência do intestino médio do camarão branco	39
Figura 5- Microscopia eletrônica de transmissão do conteúdo luminal do intestino médio do camarão branco	40
Figura 6- Atividade enzimáticas dos compartimentos do intestino médio do camarão branco sobre sucAAPF-pNA, bzR-pNA e L-pNA	42
Figura 7- Atividade proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco	44
Figura 8- Zimograma de atividade proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%	45
Figura 9- Atividade das proteinases do grupo controle frente aos diferentes substratos protéicos	48

Figura 10- Atividade dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco com suplementação de proteínas na dieta	49
Figura 11- Comparativo de atividade dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco	50
Tabela 1- Densitometria de bandas das atividades proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%	52
Figura 12- Densitometria de bandas das atividades proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%	53
Figura 13- Zimograma de normalização de atividade proteolítica e de proteínas dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%	55
Figura 14- Atividade proteolítica das frações de gel SDS-PAGE 12% após eletroforese	56
Figura 15- Visualização da circulação endo ecto-peritrófica no camarão branco	58
Figura 16- Atividade das frações obtidas na cromatografia de troca iônica (Hi-trap Q) de extratos de hepatopâncreas frente aos substratos protéicos	60

Sumário

	Página
1 – Introdução	19
1.1 - Carcinicultura e seus desafios	19
1.2 - Organização da digestão no camarão branco	21
1.3 – Bioquímica da digestão no camarão branco	23
1.4 – Circulação endo-ectoperitrófica	25
2. – Objetivos.	27
2.1. – Objetivos específicos	27
3. – Matérias e métodos	28
3.1. – Materiais e Reagentes	28
3.2. – Animais e preparação das amostras	29

3.3. – Determinação de pH ótimo para hidrolases	32
3.4. – Atividades de proteinases	32
3.5. – Microscopia de Luz – LM	33
3.6. – Microscopia de Transmissão – TEM	34
3.7 - Análises estatísticas dos dados	34
4. – Resultados e Discussão.	35
4.1 – Determinação de pH <i>in vivo e in vitro</i>	35
4.2 – Microscopias confirmam a presença da membrana peritrófica	39
4.3 – Atividades de proteinases comprovam circulação endo-ectoperitrófica	43
4.4 – Circulação endo-ectoperitrófica evidenciada com corantes	59
4.5 - Perfil cromatográfico das proteinases	61

5 – Considerações Finais	63
6 - Referências bibliográficas	64

1 – Introdução

1.1 – A Carcinicultura e seus desafios

A carcinicultura é o cultivo de camarões para fins comerciais e esta atividade vem crescendo nos últimos anos no Brasil, a exemplo de outras regiões no mundo. Os camarões possuem importância econômica, distribuídos por todo tropical e subtropical em todas as regiões do mundo e são submetidos intensa pesca em locais onde eles ocorrem. Por causa da pressão contínua sobre os estoques pesqueiros de camarões para consumo humano, carcinicultura em muitos países se desenvolveu como uma importante ferramenta para suprir fonte de proteína de crustáceos e receita (Li, et al., 2012).

A importância de estudos na área de aquicultura como atividade produtora de alimentos tem como finalidade suprir o déficit pesqueiro, devido à escassez de recursos naturais, justificando seu crescimento contínuo nos últimos anos (FAO, 2012). O cultivo de camarões marinhos encontra-se em constante desenvolvimento no mundo, e atualmente consiste na única alternativa para suprir a demanda de camarões gerada pelo aumento no consumo e pela estagnação da produção pesqueira. A expectativa de uma fonte inesgotável de proteína animal vinda dos oceanos foi substituída pela constatação de que em muitas regiões pesqueiras do mundo as reservas estão sob ameaça, com cerca de 70% dos estoques extintos ou ameaçados de extinção.

De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), mais de 50 países estão envolvidos nessa atividade, que se estende por todos os continentes, principalmente o asiático, que detém cerca de 88,91% dos camarões comercializados no mundo. Segundo essa instituição, a produção mundial do camarão marinho cultivado chegou a mais de três milhões de toneladas em 2006 e, entre os cinco principais produtores, encontram-se a China (1.242.385 Mg), Tailândia (500.800 Mg), Vietnã (349.000 Mg), Indonésia (339.803 Mg) e Índia (144.347 Mg). O Brasil ocupou a sétima posição, com a produção de 65 mil toneladas. Entre os peneídeos, destaca-se *Litopenaeus vannamei* como a espécie mais cultivada e de extrema importância na América Latina e Ásia (Rojas & Alfaro, 2007). O potencial que a aquicultura tem para minimizar esses problemas fica evidente quando se compara o rápido crescimento médio do setor (9,5%/ano) em relação a outras atividades como a pecuária (3%/ano) e a pesca por captura (1,4%/ano).

A prática da carcinicultura marinha no Brasil, ao nível industrial, teve início na década de 80 com a introdução da espécie exótica *Penaeus japonicus*. No entanto, devido à inexistência de pesquisas que possibilitassem o alcance de produtividades economicamente aceitáveis e a inaptidão desta espécie em suportar baixas salinidades, a carcinicultura brasileira se viu obrigada a descartar o *P. japonicus* e redirecionar seus objetivos ao cultivo de espécies nativas, tais como o *P. subtilis*, *P. paulensis*, *P. schimitti* e *P. brasiliensis*, bem como para a espécie exótica *L. vannamei* (Marques & Andreatta, 1998).

A introdução da espécie do camarão branco, oriunda do oceano pacífico de nome *L. vannamei*, que a partir da década de 1990 se tornou uma espécie de camarão implantada na aquicultura em todo o mundo, devido à sua fácil adaptabilidade, a taxa de crescimento rápido e importância comercial dentre outras vantagens (Zhou *et al.*, 2011). O cultivo de camarão é a principal indústria da aquicultura em muitos países, respondendo por cerca de 3.496.000 toneladas e cerca de 15 bilhões de dólares de lucro anualmente (FAO, 2012).

No Brasil, a produção de camarões marinhos ocorre, via de regra, em tanques de terra que podem variar de 0,1 a 100 hectares, construídos em ambiente natural. Seu cultivo se baseia no ciclo de vida que ocorre na natureza, respeitando as necessidades nutricionais e ambientais (temperatura, salinidade, pH, etc). A espécie *L. vannamei* é tipicamente eurialina e possui habilidade de tolerar larga variação de salinidade (0,5–40‰). Tal característica a consagrou como espécie popular para a cultura em baixa salinidade (McGraw *et al.*, 2002; Samocha *et al.*, 2002). Este fato, juntamente com a demanda crescente do mercado internacional por camarão cultivado, resultou no desenvolvimento da carcinicultura em águas de regiões interioranas, o que contribuiu para o desenvolvimento desta atividade em países como Estados Unidos (Arizona, Texas, Alabama e Flórida), Equador, Panamá e Brasil (Figueirêdo *et al.*, 2006).

A criação consiste basicamente de duas fases, a larvicultura e a engorda. A produtividade em nosso país encontra-se em torno de 5,5 toneladas/ha/ano, decorrentes principalmente de cultivos intensivos e semi-intensivos. A facilidade de cultivo do *L. vannamei* juntamente com as condições climáticas e topográficas (8.000 km de costa) tem despertado o interesse cada vez maior de investidores que vislumbram nesta atividade a possibilidade de geração de empregos, de riquezas e de alimento. Tradicionalmente, o cultivo da espécie é realizado em áreas

costeiras, embora nos últimos anos venha ocorrendo sua produção em águas oligohalinas.

No entanto, o manejo intensivo favorece a disseminação de doenças e vem causando elevados prejuízos para o setor. Apesar de recentes sucessos da carcinocultura em todo o mundo, muito pouco se sabe sobre aspectos biológicos básicos importantes desse como fonte de alimento humano e como esta informação pode ajudar a melhorar a produtividade das fazendas de camarão (Li, et al., 2012). As técnicas de produção de camarões, apesar de eficientes, sob o ponto de vista econômico, podem ocasionar impactos ambientais e sofrer perdas com doenças. O alimento não consumido pelos camarões, além das fezes, resulta no acúmulo de matéria orgânica, em especial produtos nitrogenados, levando à eutrofização do ambiente. Assim, o desenvolvimento de estratégias profiláticas que visem minimizar os impactos das enfermidades nos cultivos e formas de minimizar a eutrofização do meio ambiente são extremamente importantes e vários compostos derivados de animais, plantas, fungos e algas têm sido avaliados quanto ao potencial imunestimulante e mitigador da poluição associada ao cultivo de camarões (Xu et al., 2012).

1.2 – Organização da digestão no camarão branco

O sistema digestório do camarão branco, como de outros Decapoda, está dividido em intestino anterior, médio e posterior. Os intestinos anterior e posterior são de origem ectodérmica e são revestidos internamente por cutícula, enquanto o intestino médio é de origem endodérmica e é formado por uma camada de células multifuncionais, absorptivas e glandulares (Icely & Nott, 1992). As seguintes estruturas básicas são observadas: a boca, localizada na parte ventral do cefalotórax do camarão, em seguida vem o esôfago que liga a boca ao estômago. O estômago que se subdivide em duas câmaras, a cardíaca onde existem dentes calcificados formando um moinho gástrico que ajuda na trituração dos alimentos e a câmara pilórica. O intestino médio consiste de um tubo localizado na parte dorsal, onde a digestão e absorção dos nutrientes ocorrem. O intestino posterior é tubular e serve para compactar as fezes antes de serem evacuadas pelo ânus, localizado na parte posterior do camarão abaixo do telson (Icely & Nott, 1992).

A principal glândula digestiva é o hepatopâncreas onde é produzida e secretada a maior parte das enzimas digestivas (Icely & Nott, 1992; Lemos et al., 2000). Estudos anteriores sobre a fisiologia nutricional

peneídeos tem focado em processos de absorção de aminoácidos e de açúcar no intestino e hepatopâncreas sendo detalhada de glicina e absorção de sódio pelas células epiteliais de *Penaeus marginatus* intestino indicou que o transporte de aminoácidos sendo dependente de sódio (Simons et al., 2012).

Neste sentido, o animal captura o alimento, o reduz a pequenos pedaços e o ingere, conduzindo-o ao esôfago e posteriormente à câmara pilórica, situada no estômago, onde será novamente triturado graças à ação de uma série de estruturas calcificadas que formam o moinho gástrico. Após passar pelo moinho gástrico, no estômago o alimento é filtrado por cerdas, sendo conduzido até o segundo compartimento, a câmara pilórica. A absorção dos alimentos ocorre no próprio hepatopâncreas e no intestino médio (Icely & Nott, 1992).

As principais enzimas já descritas que fazem parte da digestão do camarão branco são as proteinases serínicas tripsinas e quimotripsinas em diferentes isoformas (Sellos & Van Wormhoudt, 1992; Le Moullac et al., 1996; Lemos et al., 2000; Garcia-Carreño et al., 2011; Sainz-Hernández & Murueta, 2009). De longe as enzimas envolvidas na digestão de proteína são as mais estudadas, o que reflete a importância desse nutriente nas dietas. De fato, proteína é um importante e o mais caro ingrediente na alimentação do camarão e também considerado como um fator limitante de crescimento (Oujifard et al., 2012).

Nutrição adequada de proteínas é essencial para o crescimento dos camarões, e a eficácia dos alimentos administrados em grande parte depende de como camarão usar proteína dietética. Além disso, teor de proteína é o item mais caro em rações de camarão e dietas artificiais representar pelo menos 50% do custo total de produção de camarão. Portanto, é essencial que a utilização da proteína e retenção é maximizada por camarão. Em camarões peneídeos, a quebra e digestão da proteína dietética para obter nutrientes é uma função fisiológica das proteinases digestivas que são sintetizadas e segregadas na glândula digestiva. Entre estas proteases, tripsina e quimotripsina são consideradas as mais importantes e abundante enzimas proteolíticas (Perea et al., 2012)

Desde a purificação e a clonagem de uma quimotripsina do hepatopâncreas por Sellos & Van Wormhoudt em 1992, vários trabalhos tem mostrado a diversidade tanto de quimotripsinas quanto de tripsinas durante o desenvolvimento do camarão branco e como a expressão dessas enzimas pode variar durante as fases e em resposta a diferentes dietas (Le Moullac & Van Wormhoudt, 1994; Sainz et al., 2004 a, b, 2005; Le Moullac et al., 1996; Ezquerro et al., 1997; Lemos et al., 2000;

Sainz-Hernández & Murueta, 2009; del Toro et al., 2011). Muito menos estudada é a contribuição de proteinases cisteínicas dos tipos catepsinas L e B na digestão de camarões, embora um recente trabalho tenha sugerido a participação de catepsina B na digestão de *L. vannamei* (Stephens et al., 2012). Embora alguns desses trabalhos tenham avançado na caracterização dessas enzimas, nenhum deles tratou da participação delas nas fases da digestão e pouco se sabe sobre as enzimas envolvidas na digestão final e intermediária de proteínas no camarão branco.

1.3 – Bioquímica da digestão no camarão branco

A maior parte do alimento que requer digestão nos crustáceos é composta por polímeros, tais como amido, celulose, hemiceluloses e proteínas. O processo digestivo ocorre em três fases: inicial, intermediária e final. Inicialmente, um decréscimo na massa molecular dos polímeros ocorre pela ação de polímero hidrolases, tais como amilases, celulasas, hemicelulasas e proteinases. Os oligômeros resultantes sofrem hidrólise por oligômero hidrolases, exemplificadas por aminopeptidases agindo sobre fragmentos resultantes da hidrólise de proteínas. Os produtos da fase intermediária da digestão são dímeros ou pequenos oligômeros, tais como maltose, celobiose e dipeptídeos, derivados da hidrólise de amido, celulose e proteínas, respectivamente. Na fase final da digestão, os dímeros são clivados até liberação de monômeros por dímero hidrolases, exemplificadas por maltase, celobiase e dipeptidases (Terra & Ferreira, 1994; 2012).

Qualquer descrição da organização espacial da digestão em um animal deve relacionar os compartimentos do sistema digestório para cada fase da digestão, e, conseqüentemente, para as enzimas correspondentes. Para isto, as determinações enzimáticas devem ser realizadas em cada compartimento luminal do trato digestivo e no tecido correspondente. Em insetos foi observado um grande avanço nos estudos sobre digestão quando passou a se ter grande cuidado na coleta de enzimas considerando-se a compartimentalização das fases da digestão (Terra & Ferreira, 1994; 2005; 2012).

Os estudos das enzimas digestivas podem ser vistos a partir de dois pontos, que consiste nas enzimas de uma única espécie ou uma comparação entre duas espécies. A proteína é um dos principais ingredientes e mais caro na alimentação camarão e também considerado um fator limitante do crescimento (Fernández-Gimenez et al., 2009). Enzimas responsáveis pela digestão da proteína alimentar foram

avaliados e caracterizados em três espécies de lagosta vermelha, usando substratos e inibidores específicos, onde foram fracionados e identificados tripsinas e quimotripsinas em gel de eletroforese (Guerrero, et al., 2004). A utilização de substratos e inibidores com a finalidade de caracterizar a atividade de uma enzima digestiva é comum em estudos bioquímicos, porém, poucos estudos propõem a divisão espacial da digestão em compartimentos, descrevendo onde ocorre a ação de enzimas responsáveis pela digestão inicial, intermediária e final. Segundo Terra e Ferreira (1994), em insetos a digestão inicial ocorre no espaço endoperitritrófico, a digestão intermediária ocorre no espaço ectoperitritrófico e a digestão final na superfície das células intestinais.

Recentemente, tripsinas sintetizadas e secretadas pelo hepatopâncreas do camarão branco *L. vannamei* foram purificadas e caracterizadas cineticamente (Sainz et al., 2005). Em outro estudo, foi transformada uma levedura para superexpressar o gene de proteínas de hemócitos, onde foi identificado a proteinase serínica SPH516 no camarão tigre preto *Penaeus monodon* (Sriphaijit et al., 2007). Tripsina apareceu ainda na evolução e ocorre em todos os filos e nos sistemas digestórios dos invertebrados, tornou-se a proteinase mais abundante (Muhlia-Almazán et al., 2008). A presença de diferentes classes de proteinases garante a digestão proteica no organismo (Chisty et al., 2009).

Segundo XU & PAN (2012), a adição de carboidratos aumenta eficazmente a crescimento de zooplâncton, o que poderia ser atribuído às maiores densidades de bactérias nos tratamentos em hidratos de carbono adicionado, os estudos têm indicaram que a adição de hidratos de carbono pode resultar na produção e acumulação de bioflocos, o que poderia servir como uma importante fonte de alimento ou abrigo para zooplâncton e, assim, aumentar o seu crescimento no presente estudo. Zooplâncton foi demonstrado como fonte de alimento suplementar para *L. vannamei*, e pelo que pode aumentar a eficiência da conversão de proteína microbiana em proteína *L. vannamei*. O aumento da participação de zooplâncton pela adição de carboidratos também pode melhorar a estabilidade alimentar e a eficiência do fluxo de materiais energia através da cadeia alimentar na intensivo sistemas de cultura de camarão. A diminuição da densidade de zooplâncton do período de atraso pode ser devido à diminuição acentuada da temperatura da água.

O detalhamento das diferentes classes de enzimas digestivas num organismo são parâmetros importantes na formulação de uma dieta

adequada nutricionalmente (Zhong et al., 2011). Neste sentido, o estudo das proteinases podem fornecer parâmetros importantes no estudo da digestão do camarão branco. A caracterização das enzimas digestivas importantes no *Panulirus argus*, apresentaram atividades proteinase e amilase no suco gástrico, enquanto atividades de lipases foram mais elevadas na glândula digestiva (Perea et al., 2008). As lipases têm um papel fisiológico fundamental, o catabolismo de triacilglicéridos (tags) armazenadas como depósitos de gordura e os de dieta lipídios (Oujifard, et al., 2012).

No trato digestivo de artrópodes, inclui intestino anterior, intestino médio e intestino, sendo o intestino médio é a única região em contato com o externo ambiente sem cobertura cutícula. A membrana peritrófica (MP) é uma membrana não celular que revestem o intestino médio artrópode, que serve como uma barreira entre o conteúdo do lúmen do intestino e o epitélio do intestino médio, protegendo o intestino médio do abrasivo partículas de alimentos e patógenos. A MP é considerada ser composta de fibrilas de quitina com glicoproteínas e proteoglicanos associados e é proposto para auxiliar o processo de digestão pela compartimentalização do lúmen intestinal em espaço endoperitrófico (entre o epitélio e da membrana peritrófica) e ectoperitrophic espaço (entre a membrana peritrófica e o lúmen) e imobilização de enzimas digestivas, permitindo aquisição de nutrientes eficiente (Wang, et al., 2012).

1.4 – Circulação endo-ectoperitrófica

Uma estrutura anatômica geralmente negligenciada nos estudos de digestão em crustáceos é a membrana peritrófica. Esta estrutura acelular geralmente de constituição quitina-protéica ocorre em vários grupos de artrópodos e reveste o bolo alimentar na luz intestinal. Segundo TERRA (2001) a membrana peritrófica evoluiu em insetos para permitir a compartimentalização das fases da digestão. A ocorrência da membrana peritrófica divide o lúmen intestinal em dois compartimentos, os chamados espaços ectoperitrófico (por fora da membrana peritrófica) e o espaço endoperitrófico (no interior da membrana peritrófica).

Na maioria dos insetos, a digestão inicial ocorre no espaço endoperitrófico, a digestão intermediária no espaço ectoperitrofico e a digestão final na superfície de células do intestino médio. Tais estudos

conduziram a formulação da hipótese da circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas (Terra et al., 1979; Terra & Ferreira, 1994). Foi sugerida a existência de um mecanismo de reciclagem através do qual o alimento flui por dentro da membrana peritrófica do intestino anterior para a parte posterior, enquanto que no espaço ectoperitrófico há um fluxo de água do intestino posterior para as regiões proximais. Quando as moléculas de alimentos poliméricos tornam-se suficientemente pequenas para passar através dos poros da membrana peritrófica, acompanhado as hidrolases, o resultado do fluxo transporta para o intestino médio anterior, onde ocorrem a digestão intermediária e a final (Terra & Ferreira, 1994; 2005, 2012; Terra, 2001).

Segundo Terra & Ferreira (1994), a compartimentalização da digestão e a existência da circulação endo-ectoperitrófica resultam em ganho de eficiência da digestão, permitindo a retirada dos oligômeros obtidos na digestão e reaproveitando das enzimas digestivas para obtenção de novos oligômeros que serão hidrolisados no espaço ectoperitrófico. Uma vez que as enzimas produzidas não são evacuadas, mas sim recicladas, há uma economia energética considerável (Terra, 2001).

Recentemente a ocorrência de membrana peritrófica foi documentada em *L. vannamei* (Xang et al., 2012). No entanto, esses autores não consideraram a existência de circulação endo-ectoperitrófica e sugerem funções à membrana peritrófica em *L. vannamei* associadas às funções que poderiam ser exercidas por muco, como resistência à abrasão e defesa contra microrganismos. Estudos preliminares confirmam a existência de membrana peritrófica no intestino médio do camarão branco, mais revelador, a distribuição em gradiente de proteinases que pode ser deslocado pela ingestão de polissacarídeo sugere fortemente a ocorrência de circulação endo-ectoperitrófica nesta espécie. Em se confirmando esse fenômeno em *L. vannamei*, será o primeiro registro fora dos insetos de sua ocorrência.

2 – Objetivos

Os objetivos deste trabalho visam elucidar a circulação endo-ectoperitrófica no camarão branco do Pacífico o *L. vannamei*, através do conhecimento da bioquímica da digestão que pode contribuir em trabalhos futuros que visem o avanço do desenvolvimento de manejos mais adequados do camarão branco do Pacífico *L. vannamei* no Brasil.

2.1 - Os objetivos específicos são:

- 1 – Determinar os valores de pH que ocorrem na luz do trato intestinal de juvenis de *L. vannamei*.
- 2 – Elaborar estudos morfológicos para evidenciar a existência da membrana peritrófica em camarões.
- 3 – Medir a atividade das enzimas digestivas frente a substrato proteico e sintético em diferentes dietas, verificando assim alterações nas atividades nos diferentes compartimentos.
- 4 – Determinação da distribuição espacial de enzimas digestivas ao longo dos compartimentos intestinais de *L. vannamei*.
- 5 - Fundamentar a circulação endo-ectoperitrófica em camarões utilizando corantes e a distribuição de proteinases ao longo do trato intestinal de *L. vannamei*.

3- Materiais e Métodos

3.1- Materiais e Reagentes

Foram utilizados materiais e reagentes que por sua qualidade garante a confiabilidade nos resultados entre estes estão:

- Pinças oftálmicas ponta número cinco, lupa de aumento, placa de petry e solução salina NaCl 250 mM preparada no laboratório com cloreto de sódio P.A (sigma) q.s.p. um litro de água destilada utilizados nas disseções.

- Reagente de Brandford (1976), padronizado com curva padrão de ovoalbumina (Sigma) para dosagem de proteínas totais nas amostras.

- Citrato de sódio (Sigma), fosfato monobásico de sódio (sigma) e fosfato bibásico de sódio (Sigma) para baterias de tampões utilizados na análise de pH ótimo.

- Azoalbumina (Sigma), ácido tricloro acético (TCA) e solução de NaOH 2N preparada com hidróxido de sódio P.A. (sigma) q.s.p. meio litro de água destilada para atividade proteolítica.

- succinil-Alanil-Alanil-Prolil-Fenilalanil-p-nitroalanina (Sigma) (suc-AAPF-pNA), substrato utilizado para medir atividade de enzimas do tipo quimotripsinas.

- N-benzoil-DL-argininil-p nitroanilida (Sigma) (bz-R-pNA), substrato utilizado para medir atividade de enzimas do tipo tripsinas.

- Leucil- p-nitroanilida (sigma) (L-pNA), substrato utilizado para medir atividade de enzimas do tipo aminopeptidases.

- Idicador universal de Yamada (1923), solução preparada com azul de timol 0.025 g, vermelho de metila 0.060 g, azul de bromotimol 0.300 g, fenolftaleína 0.500 g e etanol 500 mL q.s.p. 1L de solução em água destilada.

- Reagente Bouin ácido, Etanol P.A. (Sigma), soluções de etanol 70% e 92%, xilol, parafina, navalha, micrótomo, lâmina, lamínula, eosina, hematoxilina e esmalte para microscopia.

- Lectina marcada com isotiocianeto de fluoresceína (Sigma) (WGA-FIT), para marcação de lâminas para microscopia de fluorescência.
- Glutaraldeído (Sigma), cacodilato de sódio (Sigma), glicose (Sigma), tetróxido de ósmio (Sigma) (OsO_4), acetato de uranila (Sigma), acetato de sódio (Sigma), etanol (Sigma), acetona (Sigma), resina Spurr's, micrótomo e ultramicrótomo para microscopia eletrônica de transmissão.

3.2- Animais e Preparação das amostras

Nos experimentos descritos nesta tese foram utilizados camarões brancos da espécie *L. vannamei*. Os camarões foram mantidos e alimentação feita em tanque de criação circular, fechado, com recirculação do sistema de água do mar localizado no Laboratório de Crustáceos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM-UFSC).

Este sistema inclui tanques de sedimentação, com sistema de aeração, filtro biológico e controle da temperatura nos tanques circulares de 50.000 L constituído de fibra de vidro. Para os experimentos de alimentação foram utilizados aquários retangulares individuais com capacidade de 50 L de água contendo 30% do volume total (Fig. 1A). Cada aquário foi fornecido com a água do mar gaseificada a uma taxa de 1,5 L/min em condições de iluminação natural. A temperatura da água foi mantida a $25,9 \pm 0,15^\circ \text{C}$, o oxigênio dissolvido variou entre 5 e 6 mg/L e a salinidade foi de $35 \pm 0,1 \text{ g/L}$. Os níveis de amônia total (NH_3^+ e NH_4^+) ($0,06 - 0,3 \text{ mg/L}$), NO_2 ($0,016 \text{ mg/L}$) e NO_3 ($0,32 \text{ mg/L}$) foram registrados semanalmente de acordo com os protocolos adotados no LCM.

Os camarões foram submetidos a diferentes dietas, sendo alimentados com ração balanceada (35% proteína bruta, racial Purina) e níveis crescentes de ovoalbumina 60% e 80% (m/m) (Fig.1B), sendo utilizado um camarão por aquário submetido à aclimação em jejum de 16 horas antes da introdução das dietas, sendo cinco grupos de alimentação independentes ($n=5$).

Os juvenis de *L. vannamei* ($1,05 \pm 0,26 \text{ g}$), foram imobilizados, colocando-os em gelo e foram dissecados em solução salina fria (NaCl 250 mM), o conteúdo do estômago (Est.), hepatopâncreas (Hep.) e intestino médio foi removido. Os intestinos isolados foram divididos na

dissecção em intestino médio anterior (Ant.), intestino médio mediano (Med.) e intestino médio posterior (Post.). Os compartimentos da digestão foram homogeneizados em água destilada usando um Potter – Elvehjem e pistilo, coletados em micro tubos de plástico e centrifugados a 10.000 X G, durante 15 min a 4 ° C. Os sobrenadantes, foram coletados e posteriormente usados como fontes de enzimas. Os meios de quantificação de proteína utilizada foi o método de Bradford (1976), usando como padrão albumina de ovo.

Alternativamente, foi usado a técnica de gavagem nos camarões, para fornecer líquidos com corantes e/ou indicador proposto por Yamada (1923), que pela posição anatômica do sistema digestório do camarão que é dorsal permitindo obter informações como o pH do conteúdo luminal *in vivo* e a movimentação de corantes fluidos no interior do camarão (Fig. 1C). Para isto, os camarões foram aclimatados por dez horas em aquários individuais antes do início dos experimentos. A ingestão de indicadores ou corantes por gavagem foi realizada utilizando-se micropipeta de 100 µL com uma ponteira do tipo capilar acoplada. Ao localizar a boca na parte ventral do camarão, a ponteira é introduzida perpendicularmente ao corpo, sendo injetados 50 µL para visualização com indicadores de pH. Após a ingestão de corantes e do indicador de pH foram efetuados os registros fotográficos e em vídeo até que o corante desapareça do intestino.

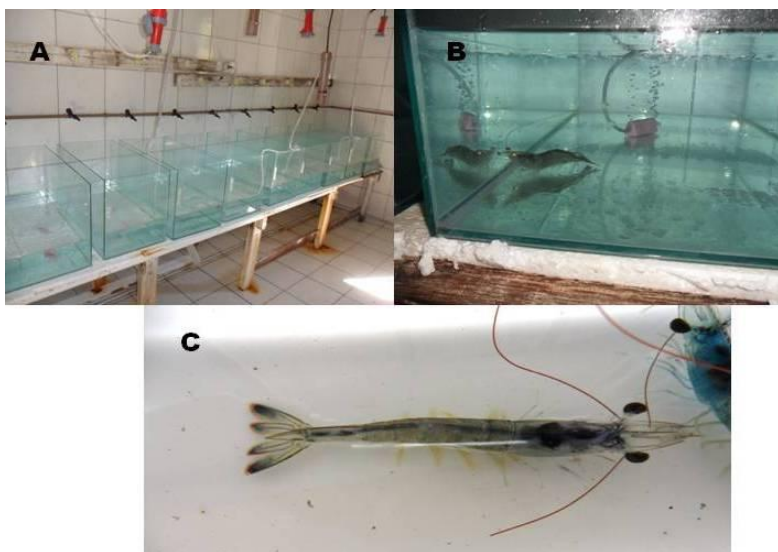


Figura 1: Imagens dos experimentos registrados. A – aquários aerados para receber os camarões. B – experimentos de alimentação dos camarões com rações com diferentes concentrações de proteínas. C – gavagem em camarões.

3.3 – Determinação de pH ótimo para hidrolases

Para poder iniciar o trabalho com as enzimas digestivas dos camarões, foi montada uma bateria de tampões em diferentes pHs. Foram utilizados o tampão citrato/fosfato 100 mM nas faixas de pH (3,0; 3,6; 4,2; 4,8; 5,4; 6,0 e 6,6) e tampão fosfato monobásico/fosfato bibásico nas faixas de pH (7,0; 7,6; 8,2; 8,8; 9,4 e 10). As faixas de pHs foram avaliadas com todos os substratos utilizados e escolhido a faixa mais adequada para ensaiar as proteinases.

3.4 - Atividades de proteinases

As atividades de proteinase total foram testadas usando azo albumina 1% em tampão fosfato 50 mM em pH 7,5. Foram incubados em triplicata 0,05 mL de extratos de enzima e substrato 1:1 (v/v), em quatro tempos de 30 minutos cada a 30 °C. A proteólise foi parada pela adição de 0,05 mL de ácido tricloroacético 30% (TCA), e posterior precipitação a 4 °C por 15 minutos seguida de centrifugação durante 20 minutos a 10.000 x g. Foram coletados 0,1 mL do sobrenadante e alcalinizados com o mesmo volume de NaOH 2N e realizadas as leituras de absorbância a 420 nm em leitor de microplacas TECAN. Os resultados foram expressos em unidades de atividade enzimática. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um valor de absorbância de 0,01 D.O por minuto. Baixos valores de atividade enzimática foram expressos como mili-unidades (mU) por animal (U/animal).

As classes e tipos de enzimas foram caracterizados usando substratos sintéticos. A atividade de tripsina foi medida com 1 mM de N-benzoil-DL-argininil-p nitroanilida (bz-R-pNA). A atividade de quimotripsina foi avaliada usando 1 mM succinil-Alanil-Alanil-Prolil-Fenilalanil-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA). A atividade de aminopeptidase foi avaliada usando 1mM Leucil- p-nitroanilida (L-pNA). bz-R-pNA, suc-AAPF-pNA e L-pNA foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2 mM e diluída 1:1 (v/v) de tampão fosfato 100 mM, pH 7,5. As análises foram realizadas em triplicatas, onde foram misturados 0,05 mL de extrato enzimático para 0,05 mL de substrato tampão, em quatro períodos de incubação com intervalo de 30 minutos cada, a temperatura de 30 °C. As reações enzimáticas foram paradas com o acréscimo de 0,1 mL de ácido acético

30% (v/v). As leituras de absorbância foram realizadas em leitor de microplacas TECAN em comprimento de onda de 410 nm. As atividades de tripsina e quimotripsina foram calculadas em mili unidades (mU), que equivale a 1 μ mol de p-NA formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de p-NA.

As atividades dos extratos enzimáticos de *L. vannamei* foram avaliados em zimograma utilizando-se géis de poliacrilamida SDS - PAGE 12% (m/v) contendo gelatina 0,1% (m/v), em um sistema de pH descontínua (Laemmli, 1970), usando o equipamento Mini - Proteína III BioRad (EUA). As amostras foram misturadas com tampão de amostra 1:3 (v/v) contendo Tris-HCl 60 mM, pH 6,8, SDS 2,5% (m/v), glicerol 10% (m/v) e azul de bromofenol 0,05% (m/v) em banho de gelo antes de serem aplicados nos géis. A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 150 V e temperatura de 4 °C, até que o marcador (azul de bromofenol) atingisse o fundo do gel. As proteinases foram renaturadas no gel com incubação em triton X-100 2,5% (m/v) durante 15 minutos. O gel foi incubado em tampão de proteólise fosfato 50 mM, pH 7,5 durante uma hora. A atividade proteolítica foi interrompida pelo acréscimo de solução corante composta de Coomassie Blue R 0,5% (m/v) em solução de etanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) em água, seguido de incubação “overnight” para corar as proteínas presentes no gel. As atividades de proteinase no gel foram reveladas pelo aparecimento de bandas claras no gel de fundo azul, após a descoloração do gel com etanol 40%(v/v), ácido acético 10% (v/v) em água. As bandas de atividades foram quantificadas com o programa GelAnalyzer.

3.5 - Microscopia de Luz – ML

Para os estudos morfológicos, intestinos médios de animais foram retirados e preparados os cortes das regiões anterior, média e posterior. Para exame histológico, as peças de aproximadamente 2 cm, foram fixadas durante 1 h em Bouin fixador, constituído de 75 mL de ácido pícrico (saturado), 25 mL de formaldeído (37-40%) e 5 mL de ácido acético glacial, desidratadas em banhos de 30 minutos cada um utilizando etanol 70%, em etanol comercial 95% e etanol absoluto 100% e dois banhos de 20 minutos de xilol 100% infiltrados e incluídos em três banhos de 20 minutos em parafina. Os cortes foram orientados na posição horizontal e transversal e deixados para solidificar por 12 horas. Secções (0,7 μ m) foram cortadas e coradas utilizando procedimentos de

rotina para hematoxilina e eosina (HE). As secções foram examinadas por microscopia de luz.

Lâminas contendo secções dos blocos coradas por HE sofreram o processo de hidratação e foram marcados com uma lectina marcada com isotiocianato de fluoresceína (WGA-FITC), que possui a capacidade de se ligar em quitina, marcando estruturas que possuem N-acetil-glicosamina.

3.6 - Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), os tecidos foram fixados durante 12 h em glutaraldeído 2,5% (m/v), em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 8,1, contendo glicose 12% (m/v). Os tecidos foram lavados em tampão (cacodilato de sódio 0,1M) durante 1h, posteriormente imerso durante 1 h em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% (m/v) diluído em cacodilato de sódio 0,1 M e coradas durante 1 h em acetato de uranila 3% (m/v) em tampão de acetato de sódio 0,1M. Após o processo de coloração, as peças foram desidratadas numa série graduada de etanol 100% e acetona 100%, apenas alterando os volumes, 75%/25% (v/v), 50%/50% (v/v), 25%/75% (v/v) e acetona 100%. Duas amostras de cada região do trato intestinal foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Amostras para MET foram infiltradas e incluídas em resina Spurr's. Após solidificar os blocos foram cortados na espessura de 0,5 μm e corados com azul de metileno e examinados por ML. As células epiteliais nestas secções foram analisadas e escolhida a melhor posição para “piramidar” o corte e fazer os cortes ultrafinos. Um mínimo de cinco cortes de cada bloco foi seccionado na espessura de 70 nm, contrastados com citrato de chumbo e examinados por MET.

3.7 – Análises estatísticas

Os dados obtidos após a leitura das absorbâncias e da fluorescência foram trabalhados no programa Microsoft Excel e Origin Pro 8.0 para obtenção dos gráficos e figuras relacionadas. Para os dados estatístico utilizou-se o programa estatístico Graph Pad Prisma 5, sendo aplicados o teste T não pareado para os dados e o ANOVA de uma via, considerando no $p < 0,05$ para significância estatística.

4– Resultados e Discussão

4.1– Determinação de pH *in vivo* e *in vitro*

Para a determinação do pH *in vivo*, foi administrado por gavagem 50 µL de indicador universal proposto por YAMADA (1923), que forneceu uma faixa de pH que varia do 3.0 ao 10.0 (Fig.2). Para a formação da escala cromática foram utilizados soluções tampões devidamente ajustada a cada valor de pH em pHmetro devidamente calibrado em soluções tampão pH 4.0 e pH 7.0. A Figura 2 apresenta a fotografia do camarão logo após a injeção do indicador, pode ser observado acima do camarão uma fotografia de um intestino dissecado e as divisões dos compartimentos da digestão e sua localização no animal. Segundo a escala cromática para o indicador universal utilizado, foi determinado que o pH no sistema digestório do camarão está em torno do pH 7,0.

As análises de homogeneizados dos três segmentos do intestino médio foram ensaiadas com os diferentes substratos para verificar a presença de proteinases, em concentrações de 100 mM para os tampões citrato/fosfato nas faixas de pH 3,0, 3,6, 4,2, 4,8, 5,4, 6,0 e 6,6 e na mesma concentração os tampões fosfato monobásico/fosfato bibásico nas faixas de pH 7,0, 7,6, 8,2, 8,8, 9,4 e 10. A Fig.3 apresenta os resultados obtidos para atividades de proteinases, os substratos utilizados foram azo albumina, suc-AAPF-pNA e bz-R-pNA, cada seguimento apresenta cor de linha e símbolo diferente, porém, os resultados foram normalizados em dois eixos a esquerda os valores de atividade na porção anterior do intestino médio e a direita os valores das porções médio e posterior. O valor de pH aonde os seguimentos apresentam maior atividade é o pH 7.6 para todos os substratos.

Segundo TERRA & FERREIRA (1996), são necessários a definição das condições para o estudos das hidrolases. Como primeiro passo foram realizados estudos para determinar estas condições, sendo o pH para atividade das proteinases determinado em pH 7,6 (Fig. 3) resultado corroborado com a injeção de indicador universal, onde foi observado que pH fisiológico do camarão branco fica em torno de pH 7,0 (Fig. 2).

O esperado para o estudo das proteinases digestivas seria que o pH do conteúdo luminal fosse o mesmo do pH ótimo, porém, o que se

observa é uma pequena diferença numérica que se for colocada em escala logarítmica torna se grande as diferenças nos valores do pH ótimo *in vivo* e *in vitro*. Mas estas diferenças são explicáveis pelo fato que *in vitro*, a tendência é ser otimizado as atividades das enzimas majoritárias, visto que não foi trabalhado com uma amostra de enzima pura ou purificada. *In vivo* a tendência é que ocorra um equilíbrio que otimize o processo de digestão como um todo, sendo assim, no pH 7,0 favorece todas as enzimas digestivas bem como o processo de absorção, neste caso não haveria um estresse de atividade no processo digestório.

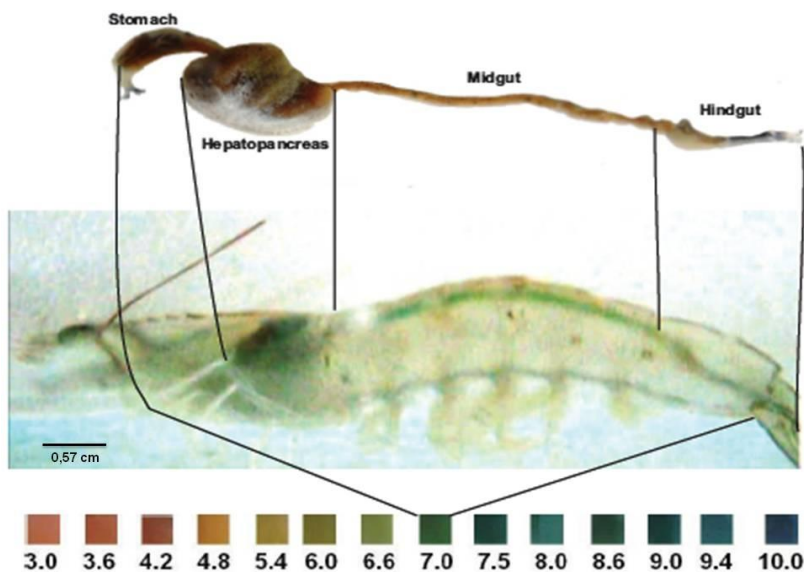


Figura 2. pH *In vivo* no camarão branco. Fotografia de juvenil de *L. vannamei* representando acima do camarão inteiro o intestino dissecado com os compartimentos identificados (estômago, hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior), após a injeção do corante e a cor característica associado a escala cromática abaixo.

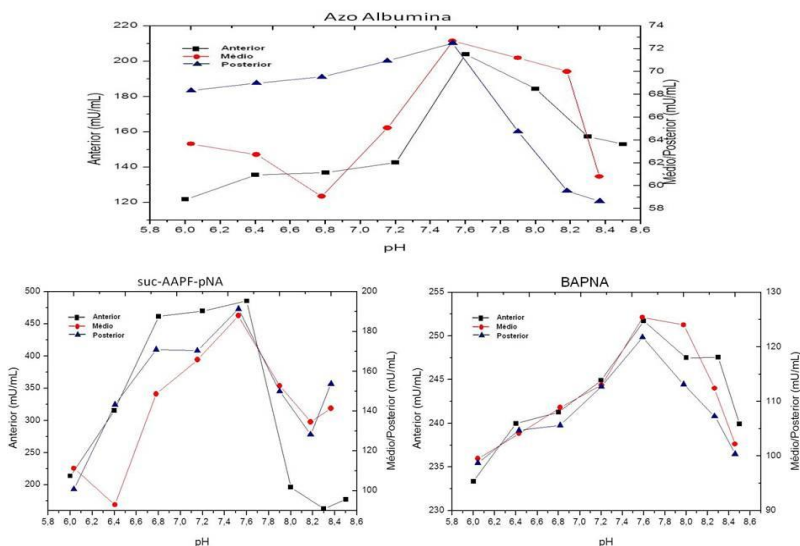


Figura 3. pH ótimo para o estudo das proteinases. Os gráficos apresentam os valores de atividade para cada valor de pH nas secção do intestino médio (anterior, médio e posterior) para os substratos azo albumina, suc-AAPF-pNA e BAPNA. Ao lado esquerdo o eixo de atividade da secção anterior e ao lado direito o eixo das atividades das secções médio e posterior, normalizados para melhor visualização de pH que as enzimas digestivas do camarão branco apresenta maior capacidade em hidrolisar os substratos.

4.2– Microscopias confirmam a presença da membrana peritrófica

As fotos de microscopia de luz (Fig. 4 A, B e C) de intestino médio coradas por HE apresentam o intestino médio num corte transversal, onde são visualizados o epitélio intestinal bem como o conteúdo luminal e nas aproximações são evidenciados uma fina membrana que separa o conteúdo luminal do epitélio sendo um indicativo da existência de membrana peritrófica. Para confirmar a existência da membrana peritrófica foram realizadas microscopia de fluorescência com cortes transversais sem a presença de corantes, porém, pré incubados por uma hora com WGA-FITC (Fig. 4 D e E). O WGA-FITC possui a característica de se ligar a membrana peritrófica e ao ser excitado com o laser azul produz uma coloração verde onde o WGA se liga. Podemos verificar uma coloração verde que circunda todo o conteúdo luminal bem como alguma substância quitinosa presentes no conteúdo luminal provavelmente vindo da dieta. Com estas imagens podemos determinar que o camarão branco possui membrana peritrófica e que a mesma deve conter quitina na sua composição.

As micrografias eletrônicas das regiões próximas ao conteúdo luminal condizem com os fatos encontrados na microscopia de luz e fluorescência (Fig. 5 A, B, C e D). Destacamos a presença das microvilosidades do epitélio intestinal o conteúdo luminal e a membrana peritrófica que circunda o lúmen.

Segundo MARTIN et al., (2006), o camarão *Sicyonia ingentis* possui membrana peritrófica visualizada com microscopia eletrônica de transmissão e confirmada com microscopia de luz, com cortes marcados com WGA-FITC que se liga a quitina presente na membrana peritrófica. Nos experimentos apresentados no presente trabalho também foram confirmadas a presença da membrana peritrófica por microscopia de luz, pré incubando os cortes com WGA-FITC e visualizados no microscópio de fluorescência (Fig. 4), bem como nas micrografias eletrônicas de transmissão (Fig. 5). Ao se identificar a membrana peritrófica é possível realizar experimentos bioquímicos que auxilie na comprovação da circulação endo-ectoperitrófica no camarão branco. Segundo Terra & Ferreira (1996), as atividades enzimáticas apresentam um padrão decrescente ao longo do intestino médio, que pode ser desfeito ao aumentar o substrato, sendo assim temos no camarão branco a membrana peritrófica bem como a formação de um gradiente enzimático

decrecente ao longo do intestino médio que foi desfeito pela adição de ovoalbumina.

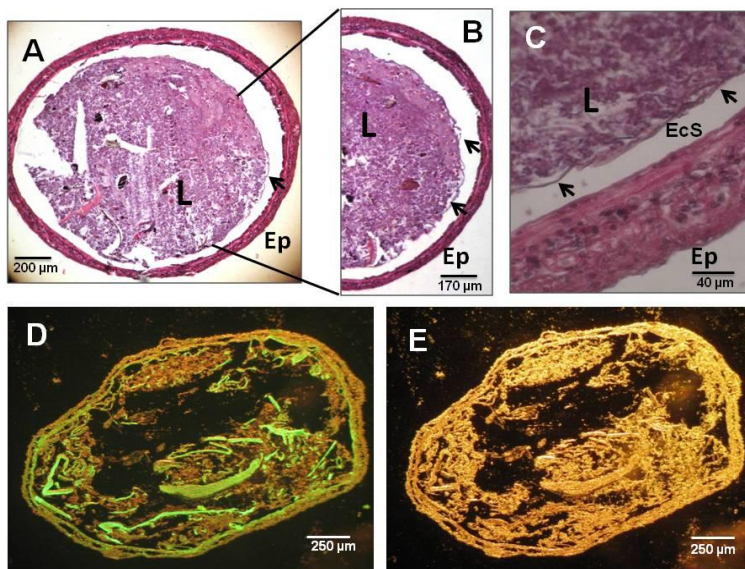


Figura 4: Microscopia de luz e fluorescência do intestino médio do camarão branco. Cortes histológicos do intestino médio do camarão branco, na posição transversal, com coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) no aumento de dez vezes (A), vinte vezes (B) e sessenta vezes (C), nos cortes visualizados em microscópio de fluorescência encontra-se a marcação com WGA-FITC no aumento de dez vezes (D) e o campo claro do mesmo corte no mesmo aumento (E). Em destaque o conteúdo luminal (L), o epitélio intestinal (Ep), espaço ectoperitrófico (EcS) e a membrana peritrófica indicada pelas setas.

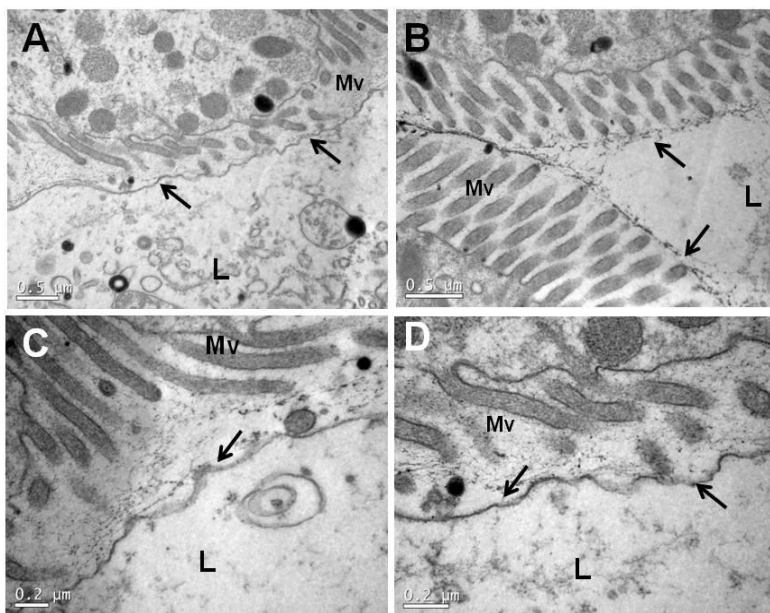


Figura 5: Microscopia eletrônica de transmissão de uma secção do intestino médio do camarão branco. Cortes histológicos ultrafinos do intestino médio do camarão branco, preparados para visualização da membrana peritrófica. Em destaque nas micrografias as microvilosidades intestinais (Mv), o conteúdo luminal (L) e a membrana peritrófica indicada pelas setas.

4.3 – Atividades de proteinases comprovam circulação endo-ectoperitrófica.

Utilizando apenas a dieta controle foram dissecados cinco grupos e isolados os compartimentos da digestão intestinal, sendo eles o epitélio, o espaço ectoperitrófico e o espaço endoperitrófico. A Fig. 6 apresenta o resultado das atividades enzimáticas frente aos substratos sucAAPF-pNA, bzR-pNA e L-pNA. Os resultados demonstram que todas as atividades proteolíticas analisadas são secretadas para o lúmen, as atividades presentes no epitélio são baixas em comparação aos compartimentos onde há transição de líquidos. Observa-se que no espaço ectoperitrófico a atividade sobre suc-AAPF-pNA é menor em comparação ao espaço endoperitrófico não havendo diferença estatística nos demais substratos, contudo são observados dentro de um mesmo compartimento a atividade maior sobre o substrato sucAAPF-pNA, o substrato bzR-pNA com atividade intermediária e o substrato L-pNA com menor atividade entre todos os substratos.

Segundo Muhlia-Almazán et al. (2008), a constituição das enzimas digestivas pode definir um papel importante na função nutricional das espécies e isso pode determinar a eficiência e o aumento de massa corporal. As enzimas de digestão inicial são essenciais para transformar os polímeros da digestão em oligômeros, que serão consumidos pelas enzimas de digestão intermediária a final (Terra, 2010).

Ao serem separados os compartimentos da digestão no intestino médio, são obtidos importantes informações como o fato de que todas as enzimas que fazem parte da digestão independente a fase que ela atue, são secretas, visto que as atividades testadas para enzimas do tipo tripsinas, do tipo quimotrisinas e aminopeptidases tem atividades aumentadas no espaço endoperitrófico e no espaço ectoperitrófico com baixa atividade no epitélio. Outra informação importante é que ocorre comunicação entre o espaço endoperitrófico com o espaço ectoperitrófico, visto que, salvo a atividade para enzimas do tipo quimotripsinas que apresentam diferenças estatística entre os espaços endo e ectoperitrófico os demais estão presentes nas mesmas proporções nos dois espaços.

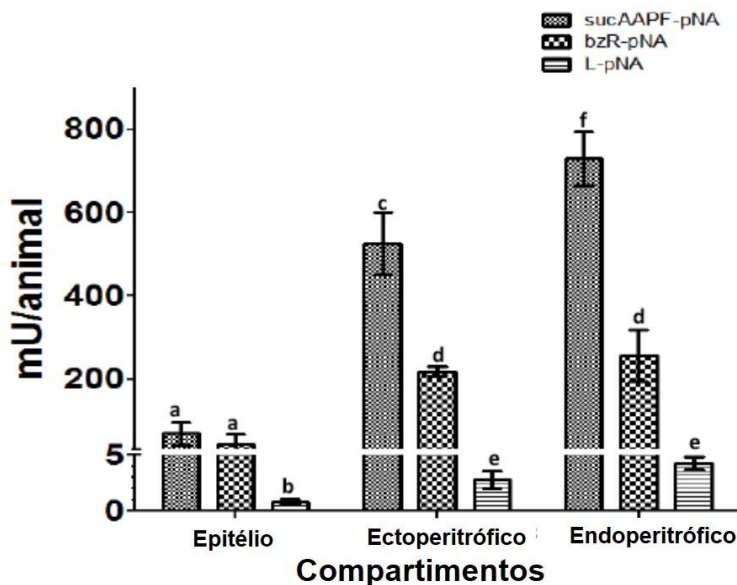


Figura 6: Atividade enzimáticas dos compartimentos do intestino médio do camarão branco sobre sucAAPF-pNA, bzR-pNA e L-pNA. Foram isolados e analisadas as atividades dos compartimentos do intestino médio o epitélio (Epitélio), espaço ectoperit f ico (Ectoperit f ico) e espaço endoperit f ico (Endoperit f ico) frente aos substratos sucAAPF-pNA, bzR-pNA e L-pNA em camarões alimentados com ração para camarões 35% de proteína. São observados que as atividades enzimáticas observadas são secretadas devido a presença no epitélio ser baixa enquanto nos compartimentos que possuem a circulação de água estas atividades estão aumentadas, sendo as letras (a, b, c, d e e) marcam as diferenças estatísticas para um $n = 5$ e $p < 0,05$.

As atividades das proteinases presentes no camarão branco apresentaram resultados semelhantes de acordo com o perfil tanto para o substrato proteico (azoalbumina) quanto para os substratos sintéticos (bz-R-pNA, suc-AAPF-pNA e L-pNA). A maior quantidade de atividade por animal encontra-se no hepatopâncreas. Ao comparar o grupo controle com os demais grupos, verificou-se que o aumento de proteína (ovoalbumina) na dieta desloca as atividades das enzimas secretadas que começam a apresentar maiores atividades nas porções média e posterior do intestino médio (Fig. 7).

Ao comparar dentro do grupo controle verificamos que as bandas de atividade de mesma migração eletroforética estão presentes no hepatopâncreas (H), estômago (S), intestino médio anterior (AM), intestino médio médio (MM), intestino médio posterior (PM) e fezes (F) coletadas durante a alimentação com as dietas controle (Control), suplementada 60% (m/m) com ovo albumina (60%Protein) e suplementada 80% (m/m) com ovo albumina (80% Protein). Ao comparar os demais grupos verificamos uma intensificação das bandas de atividade nas porções média e posterior do intestino médio quando se aumentam gradativamente as concentrações da proteína (Fig. 8).

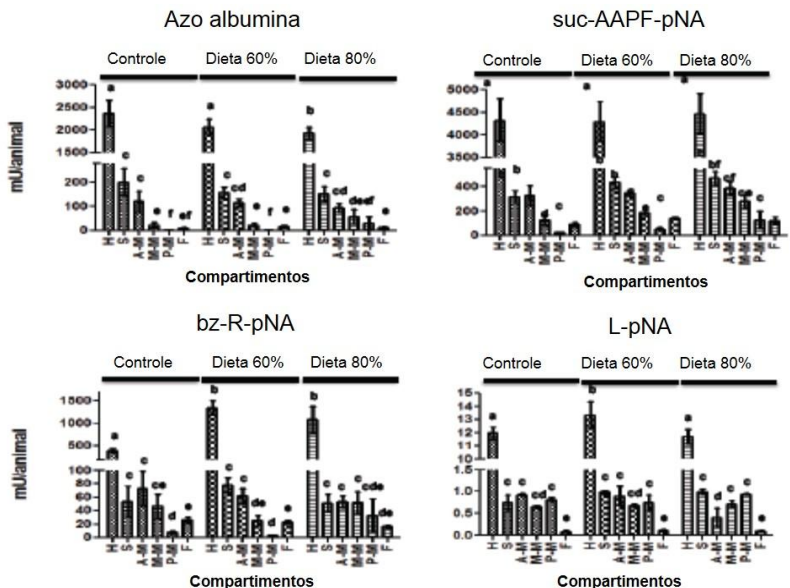


Figura 7: Atividade proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco. Foram analisadas as atividades dos compartimentos digestivos hepatopâncreas (H), estômago (S), intestino médio anterior (A-M), intestino médio médio (M-M), intestino médio posterior (P-M) e fezes (F) frente ao substrato azoalbumina, sucAAPF-pNA, bzR-pNA e L-pNA nos diferentes grupos contendo dieta com ração comercial 35% de proteína (Controle), com ração contendo 60% de proteínas (Dieta 60%) e ração contendo 80% de proteínas (Dieta 80%), sendo utilizada ovoalbumina como proteína de suplemento. Verifica-se que ocorre um gradiente decrescente de atividades dentro de cada grupo e um aumento de atividades nas porções médio e posterior quando se aumentam a concentração de proteína. As letras representam as diferenças estatísticas para um $n=5$ com $p<0,05$.

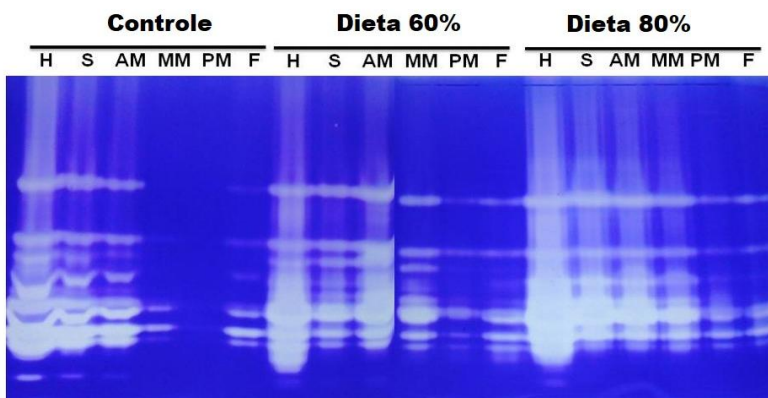


Figura 8: Zimograma de atividade proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%. Foram separadas por eletroforese as atividades dos compartimentos digestivos hepatopâncreas (H), conteúdo do estômago (S), intestino médio anterior (AM), intestino médio médio (MM), intestino médio posterior (PM) e fezes (F) em SDS-PAGE 12% contendo gelatina 1%, nos diferentes grupos contendo dieta com ração comercial 35% de proteína (Controle), com ração contendo a suplementação para 60% de proteínas (Dieta 60%) e ração contendo a suplementação para 80% de proteínas (Dieta 80%). Verifica-se uma diminuição na intensidade de banda com relação ao grupo controle chegando até algumas bandas desaparecerem principalmente no intestino posterior e um aumento de atividades nas porções anterior, médio e posterior quando se aumentam a concentração de proteína na dieta.

Segundo BALTI et al. (2012), um zimograma pode ser utilizado para definir as atividades presentes num extrato enzimático. No presente trabalho foram apresentados zimogramas das atividades proteolíticas (Fig. 8). O padrão de distribuição das bandas sugere que todas as atividades proteolíticas são secretadas no hepatopâncreas e se distribuem no trato digestório. Porém, há enzimas que são deslocadas até a porção posterior do intestino médio e outras já diminuem bastante sua atividade proteolítica já na porção média do intestino médio. Quando comparados os zimogramas dos grupos suplementados com 60% e 80% de proteínas na dieta, observa-se que atividades antes não observadas nas porções média e posterior começam a aparecer.

A distribuição espacial das atividades de proteinases presentes no camarão branco apresentou um perfil semelhante nos compartimentos do grupo controle. Ao serem incubados com o substrato proteico (azalbumina) e para os substratos sintéticos (bz-R-pNA, suc-AAPF-pNA e L-pNA), a maior quantidade de atividade por animal encontra-se no hepatopâncreas ao comparar as atividades dentro do mesmo grupo (Fig. 9), que vai diminuindo gradativamente ao longo do intestino médio. Especialmente as atividades de proteinases de digestão inicial mostram o padrão decrescente ao longo do intestino médio, fato este que não se observa quando o substrato é o L-pNA (digestão final), que não se encontra diferença significativa de atividade nos diferentes compartimentos.

Este padrão de distribuição de atividade enzimática apresentando um decréscimo ao longo do intestino médio é característico de seres que possuem a circulação endo-ectoperitrofica, pois ao formar o complexo enzima substrato, a enzima vai reduzindo o tamanho do substrato até que ambos atravessem a membrana peritrófica (Fig. 2 e Fig. 3) encontrando um contrafluxo de água que os transporta para as porções iniciais do intestino médio, sendo os monômeros absorvidos e as enzimas reutilizadas na digestão.

Quando os camarões foram submetidos a dietas com suplementação de proteína (60% e 80%), observa-se que as atividades aumentam em comparação com o grupo controle (Figs. 9 e 10) sendo que na proporção de 80% não há diferença estatística para os substratos azalbumina e suc-AAPF-pNA e para os demais resultados foram próximos os valores médios dos compartimentos. Ao analisar os compartimentos em relação ao grupo controle (Fig. 11), observa-se que não há um aumento

significativo de atividade no hepatopâncreas, sendo que frente ao substrato azoalbumina (A) a atividade proteolítica diminui na dieta 80%. Porém, ao longo do intestino médio com o aumento na quantidade de proteína as atividades aumentam, o que comprava que o gradiente decrescente de enzima é desfeito como consequência do alto aumento em quantidade de proteína na dieta.

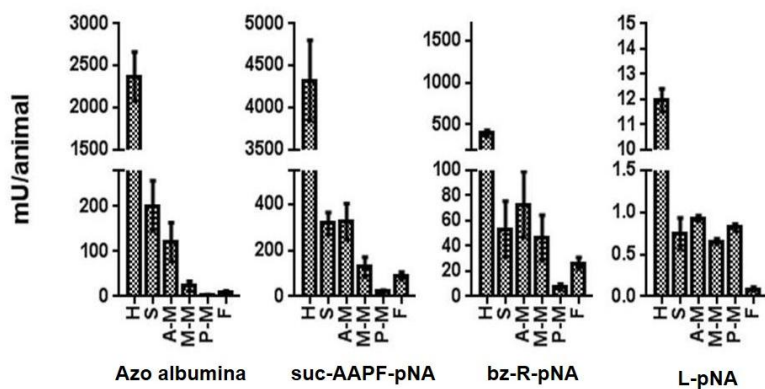


Figura 9: Atividade das proteinases do grupo controle frente aos diferentes substratos proteicos. Os gráficos apresentam os valores representativos para os compartimentos da digestão do *L. vannamei* hepatopâncreas (H), estômago (S), intestino médio anterior (A-M), intestino médio mediano (M-M), intestino médio posterior (P-M) e fezes (F) frente aos substratos azo albumina, suc-AAPF-pNA, bz-R-pNA e L-pNA para um $n = 5$ animais.

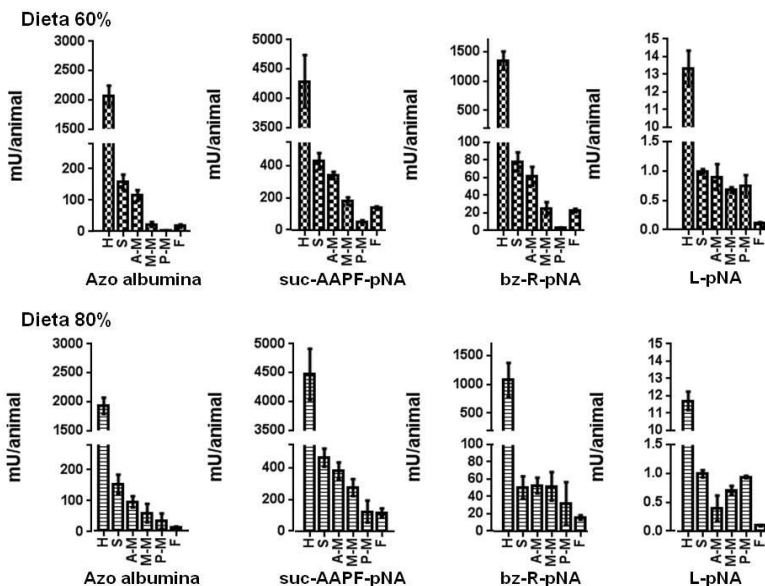


Figura 10: Atividade dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco com suplementação de proteínas na dieta. Foram analisadas as atividades dos compartimentos digestivos hepatopâncreas (H), estômago (S), intestino médio anterior (A-M), intestino médio médio (M-M), intestino médio posterior (P-M) e fezes (F) frente ao substrato azoalbumina, sucAAPF-pNA, bzR-pNA e L-pNA nos diferentes grupos contendo ração 60% (Dieta 60%) de proteínas e ração 80% (Dieta 80%) de proteínas, sendo utilizada a ovoalbumina como proteína de suplemento.

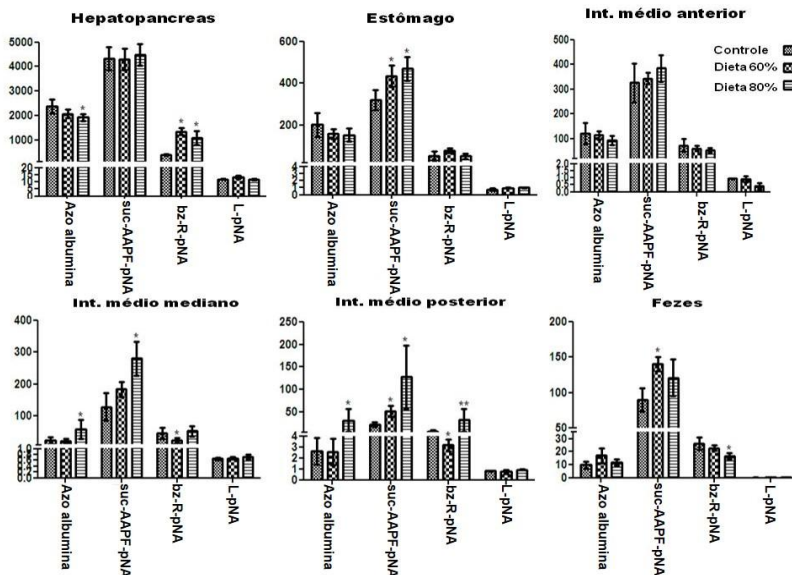


Figura 11: Comparativo de atividade dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco. Foram comparadas as atividades dos compartimentos digestivos hepatopâncreas, estômago, intestino médio anterior, intestino médio mediano, intestino médio posterior e fezes frente ao substrato azo albumina (A), sucAAPF-pNA (B), bzR-pNA (C) e L-pNA (D) dos diferentes grupos contendo ração 35% (Controle) de proteínas, ração 60% (Dieta 60%) de proteínas e ração 80% (Dieta 80%) de proteínas, sendo utilizada a ovoalbumina como proteína de suplemento para um n=5 lotes independentes com 5animais.Os símbolos (*) e (**) representam diferenças estatísticas para um $p<0,05$.

Quando a sequência de géis é analisada pelo programa Gel Analyzer (Tab. 1), observa-se que ao fazer a média dos grupos ($n= 5$) e normalizando os valores em porcentagem para o maior valor de luminescência do grupo controle, valores diminuem ao longo dos compartimentos, em alguns casos são zerados ou não detectados no intestino médio posterior. Ao fazer a suplementação de proteínas, de um modo geral os valores aumentam e as bandas que não ocorrem com tanta intensidade tanto no intestino médio mediano quanto no intestino médio posterior surgem e apresentam valores maiores que zero (Tab. 1). Dos resultados obtidos na Tabela 1 foi montado um gráfico onde ficam melhor representados os valores indicados na Tabela (Fig. 12). Nestes gráficos são demonstrados os aumentos das atividades, principalmente as de maior migração relativa (RF) nas eletroforeses em SDS-PAGE 12% contendo 1% de gelatina, das atividades das proteinases que aparacem após incubada em tampão de proteólise e reveladas com coomassie blue. Segundo del Torro et al. (2011), podem ser feitas análises comparativa utilizando zimograma de diferentes animais, neste caso específico temos diferentes condições de alimentação, onde são observados um deslocamento das enzimas digestivas em relação ao grupo controle.

Controle						
Rf	Intp	Int	Int A	Int M	Int P	Ferex
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.358	45,484 ± 0.57	76,638 ± 0.003	67,404 ± 0.08	0 ± 0	0 ± 0	8,118 ± 0.03
0.518	47,838 ± 0.88	68,540 ± 0.05	68,210 ± 0.002	0.008 ± 0.08	0 ± 0	14,045 ± 0.08
0.577	46,166 ± 0.07	32,291 ± 0.002	11,365 ± 0.57	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.671	59,204 ± 1.2	49,541 ± 0.07	63,451 ± 0.08	0 ± 0	0 ± 0	10,695 ± 0.002
0.712	49,3605 ± 0.005	24,923 ± 0.08	36,249 ± 0.08	46,458 ± 0.03	0.647 ± 0.003	77,815 ± 0.08
0.784	45,078 ± 0.7	21,493 ± 0.001	42,865 ± 0.03	62,359 ± 0.002	2,577 ± 0.07	86,279 ± 0.05
0.83	55,530 ± 0.003	35,301 ± 0.05	28,305 ± 0.005	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.851	148,700 ± 0.001	87,503 ± 0.034	21,052 ± 0.005	7,854 ± 0.05	0 ± 0	27,868 ± 0.08
0.925	12,727 ± 0.002	17,514 ± 0.76	4,323 ± 0.03	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Dieta 60%						
Rf	Intp	Int	Int A	Int M	Int P	Ferex
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.358		53.887	89,756 ± 0.08	81,005 ± 0.05	86,178 ± 0.08	15,283 ± 0.03
0.518	23,894 ± 0.08	82,118 ± 0.05	95,082 ± 0.08	84,148 ± 0.5	0 ± 0	41,467 ± 0.03
0.577	25,492 ± 0.002	78,201 ± 0.018	78,175 ± 0.05	68,793 ± 0.01	78,130 ± 0.045	29,267 ± 0.08
0.671	80,454 ± 0.005	88,628 ± 0.05	107,366 ± 0.08	57,783 ± 0.05	0 ± 0	34,239 ± 0.03
0.712	100,872 ± 0.08	64,176 ± 0.03	145,356 ± 0.051	80,069 ± 0.08	6,017 ± 0.05	118,895 ± 0.08
0.784	116,155 ± 0.08	201,805 ± 0.08	171,666 ± 0.05	236,811 ± 0.03	84,540 ± 0.012	129,287 ± 0.05
0.83	94,459 ± 0.05	120,174 ± 0.002	109,843 ± 0.08	116,847 ± 0.019	23,076 ± 0.08	89,060 ± 0.05
0.851	139,598 ± 0.03	54,212 ± 0.041	95,413 ± 0.08	52,242 ± 0.02	14,450 ± 0.07	18,847 ± 0.08
0.925	4,668 ± 0.08	3,871 ± 0.05	4,047 ± 0.05	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Dieta 80%						
Rf	Intp	Int	Int A	Int M	Int P	Ferex
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0.358	18,347 ± 0.05	49,157 ± 0.07	43,454 ± 0.05	67,525 ± 0.82	40,004 ± 0.03	46,478 ± 0.01
0.518	22,161 ± 0.002	23,223 ± 0.05	22,021 ± 0.002	48,020 ± 0.35	19,037 ± 0.003	28,058 ± 0.002
0.577	26,517 ± 0.064	15,465 ± 0.002	22,462 ± 0.23	40,795 ± 0.069	5,865 ± 0.7	4,992 ± 0.03
0.671	27,738 ± 0.03	41,262 ± 0.23	63,771 ± 0.05	46,080 ± 0.05	34,118 ± 0.002	37,418 ± 0.014
0.712	148,325 ± 0.19	45,504 ± 0.002	103,430 ± 0.002	59,813 ± 0.01	57,148 ± 0.31	0 ± 0
0.784	134,686 ± 0.76	51,593 ± 0.15	129,551 ± 0.15	54,110 ± 0.07	60,880 ± 0.46	82,484 ± 0.002
0.83	132,027 ± 0.002	103,734 ± 1.88	123,990 ± 0.03	118,226 ± 0.002	103,836 ± 0.03	128,099 ± 0.31
0.851	715,404 ± 1.23	53,053 ± 0.002	58,894 ± 0.05	56,362 ± 0.05	28,455 ± 0.03	29,490 ± 0.002
0.925	12,116 ± 0.05	2,841 ± 0.05	11,061 ± 0.05	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabela 1: Densitometria de bandas das atividades proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%. Foram comparadas no programa Gel Analyzer as atividades enzimáticas dos zimogramas SDS-PAGE 12% contendo gelatina 1%, nos diferentes grupos contendo dieta com ração comercial 35% de proteína (Controle), com ração contendo a suplementação para 60% de proteínas (Dieta 60%) e ração contendo a suplementação para 80% de proteínas (Dieta 80%) dos compartimentos intestino anterior (AM), intestino médio (MM) e intestino posterior (PM). Verifica-se que há um aumento na atividade proteolítica na comparação compartimento e que há um deslocamento de atividades para o compartimento subsequente, porém, nem todas as atividades se deslocam na mesma proporção, em destaque os resultados mais relevantes.

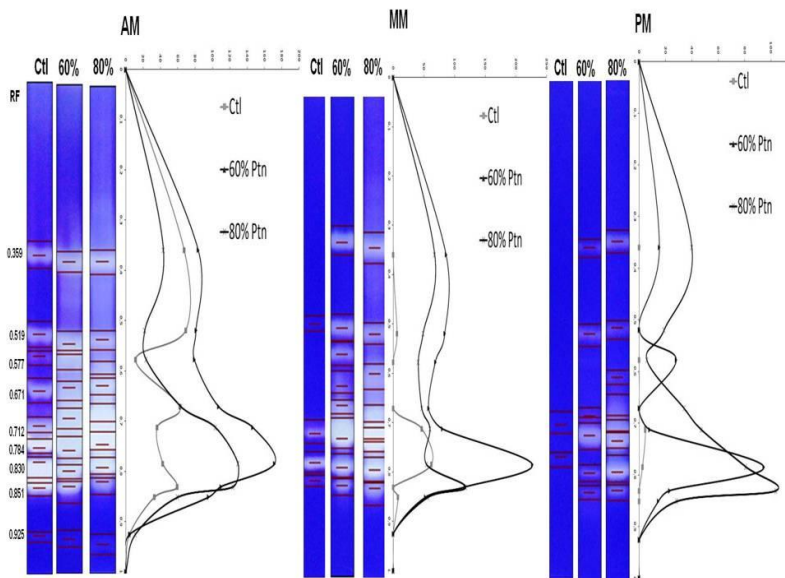


Figura 12: Densitometria de bandas das atividades proteolítica dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%. Foram comparadas no programa Gel Analyzer as atividades enzimáticas dos zimogramas SDS-PAGE 12% contendo gelatina 1%, nos diferentes grupos contendo dieta com ração comercial 35% de proteína (Ctl), com ração contendo a suplementação para 60% de proteínas (60%) e ração contendo a suplementação para 80% de proteínas (80%) dos compartimentos intestino anterior (AM), intestino médio (MM) e intestino posterior (PM). Verifica-se que há um aumento na atividade proteolítica na comparação entre diferentes compartimentos e que há um deslocamento de atividades para o compartimento subsequente. No entanto, nem todas as atividades se deslocam na mesma proporção.

Para efeito comparativo foram utilizadas duas novas normalizações na comparação em zimograma (Fig. 13), onde foram aplicadas as mesmas quantidades de proteína. Para estudos comparativos foram utilizados apenas o grupo controle (Controle) e o grupo alimentado com dieta contendo a suplementação de 60% (m/m) de ovoalbumina na dieta (Dieta 60%). Foi observado o mesmo fenômeno identificado na densitometria de bandas, que há um arraste na comparação de compartimento a compartimento, mas também há algumas enzimas que são mais recicladas do que outras visto que em ambas as normalizações são observadas bandas que possuem maiores atividades iniciais no grupo controle e estão aumentadas e são intensificadas no grupo Dieta 60%.

Em experimento de modo diferente, porém, de mesmo sentido foi realizada a corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 12% e após a renaturação das enzimas digestivas, foi recortado o gel na posição horizontal e eluídas as atividades em água. Após a eluição das enzimas foram incubadas as amostras com substrato proteico (azoalbumina), substrato para enzimas do tipo quimotripsinas (suc-AAPF-pNA) e substrato para enzimas do tipo tripsinas (bz-R-pNA). Devido as atividades de maior frente relativa (RF) serem apontadas como enzimas do tipo tripsinas e estas enzimas apresentaram maior intensidade de banda nos zimogramas, as amostras foram incubadas com inibidor de enzimas do tipo tripsina extraído da soja (STI).

Neste sentido são observados na Figura 14, pontos onde as atividades são aumentadas para enzimas do tipo quimotripsinas e pontos onde as atividades são aumentadas para enzimas do tipo tripsinas. Ao serem incubadas com o inibidor STI, alguns picos de atividades desaparecem principalmente nas frações 20 e 22 para o substrato azoalbumina. As frações compreendidas entre 19 e 24 que apresentam atividade de enzimas do tipo tripsinas também desaparecem, o que já era esperado, pois nesta região são relatadas a presença das tripsinas (del Toro et al., 2011). Outro ponto onde há grande atividade de enzimas do tipo tripsinas que desaparecem na presença do STI é o pico formado pelas frações 14 e 15, porém, o fato curioso dos resultados fica em relação às atividades das enzimas do tipo quimotripsinas, onde ocorre um pico na fração 10, 13 e dois picos compreendidos entre as frações 15 a 20, que são totalmente inibidos pelo inibidor STI.

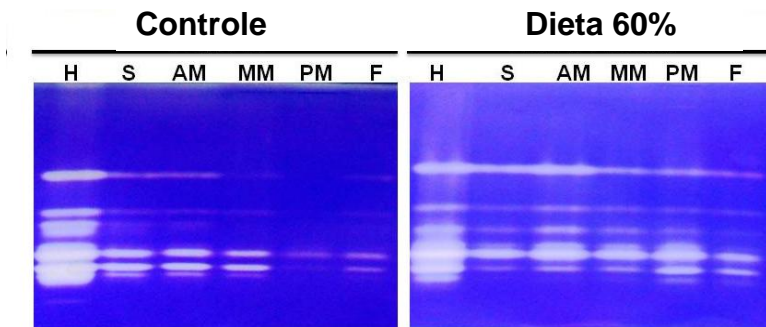


Figura 13: Zimograma de normalização de atividade proteolítica e de proteínas dos extratos dos compartimentos digestivos do camarão branco em gel SDS-PAGE 12%. Foram separadas por eletroforese as atividades dos compartimentos digestivos normalizados por quantidade de atividade apresentada in vitro (A) e quantidade de proteína (B) hepatopâncreas (H), conteúdo do estômago (S), intestino médio anterior (AM), intestino médio médio (MM), intestino médio posterior (PM) e fezes (F) em SDS-PAGE 12% contendo gelatina 1%, nos diferentes grupos contendo dieta com ração comercial 35% de proteína (Controle), com ração contendo a suplementação para 60% de proteínas (Dieta 60%). Verifica-se uma diminuição na intensidade de banda com relação ao grupo controle e um aumento de atividades nas porções anterior, médio e posterior quando se aumentam a concentração de proteína na dieta, porém, as bandas de atividades em ambas normalizações não respondem da mesma maneira.

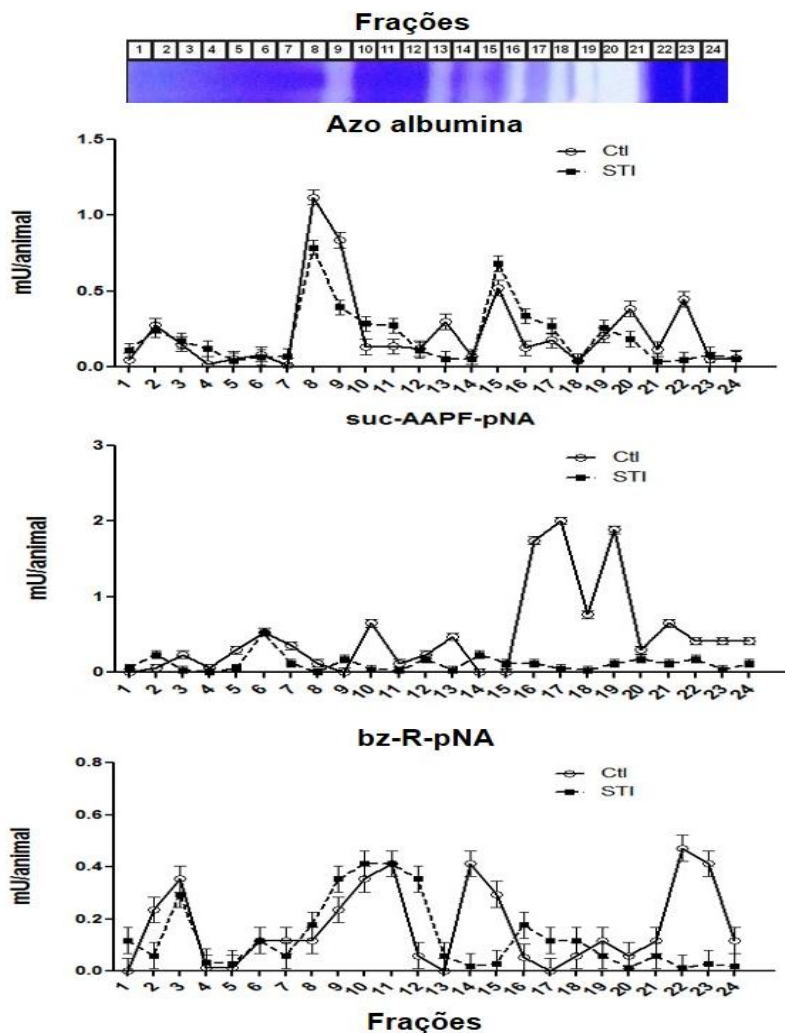


Figura 14: Atividade proteolítica das frações de gel SDS-PAGE 12% após eletroforese. Gráficos representativos das atividades proteolíticas, separadas por eletroforese e eluídas em água frente a substrato proteico (azoalbumina), substrato para enzimas do tipo quimotripsinas (suc-AAPF-pNA) e substrato para enzimas do tipo tripsinas (bz-R-pNA), sem inibidor de enzimas (Ctl) e na presença do inibidor de enzimas do tipo tripsinas extraído da soja (STI).

4.4 – Circulação endo-ectoperitrófica evidenciada com corantes

Na tentativa de visualizar a circulação endo-ectoperitrófica por transparência no camarão branco, foi injetado indicador universal de pH e foi gravado um vídeo que acompanha o tempo que o corante leva para desaparecer do intestino. Na Fig. 15 são retratados cinco instantâneos retirados do vídeo gravado com o camarão, sendo que a Fig. 15(A) o camarão branco foi fotografado segundos após serem injetados por gavagem, 50 μ L do corante, a Fig. 15(B) o camarão branco foi fotografado 1,5 minutos após a injeção, a Fig. 15(C) o camarão branco foi fotografado 2,5 minutos após a injeção, a Fig. 15(D) o camarão branco foi fotografado 4 minutos após a injeção e a Fig. 15(E) o camarão branco foi fotografado 5,5 minutos após a injeção. Nota-se que todo o trato digestório foi tomado pela coloração verde sendo facilmente visível pela transparência do camarão que ao passar do tempo o corante começa a se deslocar da parte posterior para anterior do camarão branco, onde aparece o mesmo camarão, porém, sem o corante no seu intestino ao final da série Fig. 15(E). Não houve evacuação de corantes nas fezes e no período de acompanhamento e foi possível visualizar o corante sendo carregado para a porção anterior, próximo ao hepatopâncreas.

Como previsto pela teoria da circulação endo-ectoperitrófica, as moléculas pequenas o suficiente para atravessarem a membrana peritrófica, encontram um contrafluxo no espaço ectoperitrófico que leva as enzimas secretadas e os nutrientes para as regiões absorptivas proximais, onde os nutrientes serão absorvidos e as enzimas digestivas reutilizadas (Terra & Ferreira 1996).

Segundo FOX (1956), a entrada de água oral e anal serve para manter um controle osmótico e controle da pressão interna com a externa da água do mar. Neste sentido, podem ser correlacionadas os túbulos de malpighi dos insetos, que são os apêndices digestivos responsáveis pela entrada de água de fluxo contrário ao da digestão, da região posterior para região anterior formando um contra fluxo que forma a circulação endo ectoperitrófica.

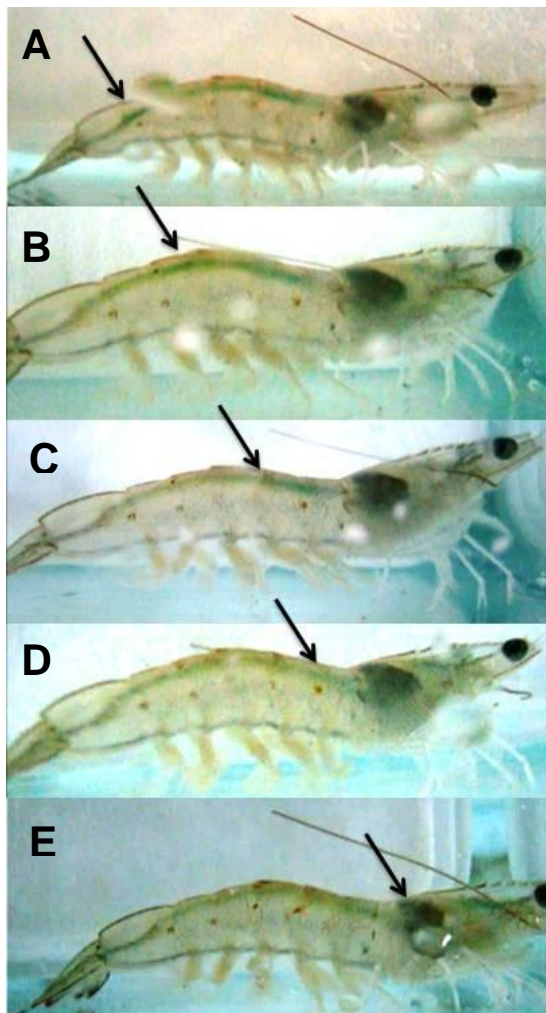


Figura 15: Visualização da circulação de corante no trato intestinal do camarão branco *L. vannamei*. Após ingestão de um indicador universal de pH pelo camarão branco o mesmo foi acompanhado através de filmagem sua trajetória o interior do trato digestivo. Sendo A o tempo zero logo após a injeção, B 1,5 minutos após a injeção, C 2,5 minutos após a injeção, D 4 minutos após a injeção e E 5,5 minutos após a injeção.

4.5 – Perfil cromatográfico das proteinases.

A separação das proteínas presentes no extrato de hepatopâncreas do camarão branco apresenta um perfil onde podemos calcular que aproximadamente dez por cento das proteínas são retidas na coluna de mono Q (Fig. 16). Ao realizar ensaios com todas as frações atividades proteolíticas com contra os substratos azoalbumina, suc-AAPF-pNA e bz-R-pNA foi verificado que todas as atividades referentes as proteinases são retidas na coluna o que facilita no enriquecimento das atividades, livrando-se de muita proteína (aproximadamente 70%) que não possui atividade digestiva.

Segundo Muhlia-Almazán et al. (2008), a constituição das enzimas digestivas podem definir um papel importante na função nutricional das espécies e isso pode determinar a eficiência e o aumento de peso. As enzimas de digestão inicial são essenciais para transformar os polímeros da digestão em oligômeros, que serão consumidos pelas enzimas de digestão intermediária a final (Terra, 2010).

Segundo BALTI et al., (2012), pode ser utilizado o hepatopâncreas como fonte de enzimas nos camarões. Processos como filtração em gel combinados com eletroforese e atividades sobre o substrato suc-AAPF-pNA para purificar e identificar quimotripsinas. Na Fig. 16, foi apresentado um perfil cromatográfico de extrato de hepatopancreas de camarão numa coluna de troca iônica Hi-Trap Q. Os resultados das frações obtidas na cromatografia apresentaram uma característica em comum, todas as atividades proteolíticas ficaram retidas na coluna, e foram eluídas apenas com a formação do gradiente salino. Neste caso, a cromatografia de troca iônica pode ser utilizada para concentrar as atividades, obtendo assim uma quantidade de enzima enriquecida e limpa o suficiente para passar por outros processos de separação de proteínas. Como apresentado por BALTI *et al.*, (2012), uma gel filtração utilizando uma coluna Superdex 75 seria uma alternativa para a purificação das diferentes proteinases.

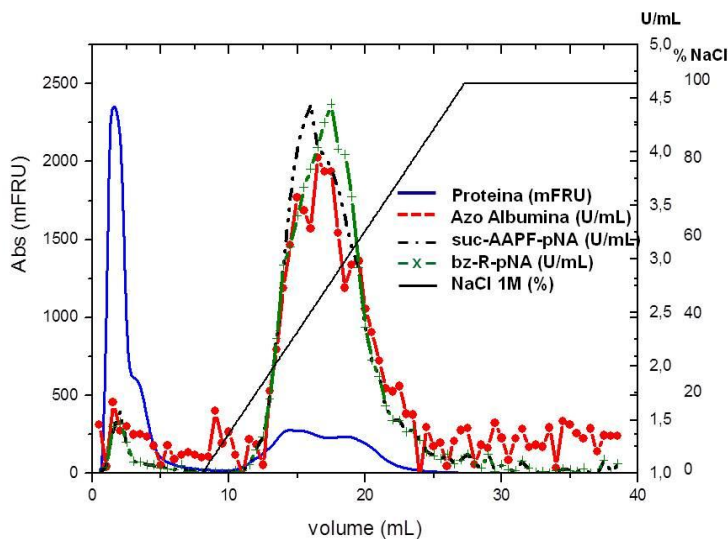


Figura 16: Atividade das frações obtidas na cromatografia de troca iônica (Hi-trap Q) de extratos de hepatopâncreas frente aos substratos proteicos. Foram analisadas as frações obtidas na cromatografia de troca iônica de extratos de hepatopâncreas de camarão. Observa-se em azul o perfil de proteínas que passaram pela coluna em todo o processo, em preto contínuo o gradiente de NaCl 1M, em vermelho com pontos a atividade sobre azo albumina, em preto pontilhado/tracejado atividade sobre suc-AAPF-pNA e em verde marcado com x atividade sobre bz-R-pNA.

5– Considerações Finais

- Os pHs ótimos para estudos das proteinases ficou estabelecido em 7,6 sendo o pH fisiológico testado com indicador universal em 7,0.
- As enzimas digestivas que são secretadas pelo camarão branco são produzidas no hepatopâncreas.
- Foi encontrado apenas um ponto de secreção de enzimas, sendo assim, pode ser utilizado o ponto onde há maior concentração enzimática.
- Existe um padrão decrescente nas atividades das proteinases nos grupos controles que foi desfeito com as suplementações de ovoalbumina.
- O padrão da atividade enzimática, associado com as figuras obtidas com as microscopias de luz e de transmissão eletrônica caracteriza a circulação endo – ectoperitrófica em camarões, fenômeno anteriormente descrito apenas em insetos.
- Os estudos com ingestão de corante reforça a tese da existência da circulação endo-ectoperitrófica em camarões, visto que foi registrado após a ingestão do corante e após o corante desaparecer do sistema digestório.
- A cromatografia de troca iônica em coluna Hi-trap Q é uma ótima ferramenta para enriquecer as atividades enzimáticas, visto que aproximadamente 30% das proteínas são retidas na coluna e essa quantidade possui grande atividade enzimática.

6 – Referências bibliográficas

- BALTI, R., BOUGHERRA, F., BOUGATEF, A., HAYET, B. K., ARROUME, N. N., DHULSTER, P., GUILLOCHON, D., NASRI, M. (2012). Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry* 130, 475–484.
- BRADFORD, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- CHISTY, M. A. H., HASHIM, R. & CHONG, A. S. C. (2009). Identification and partial characterization of selected proteolytic enzymes in the digestive system of giant freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) Postlarvae. *Aquaculture Research* 40, 519–525.
- DEL TORO, M.A.N, GARCÍA-CARREÑO. F.L., CÓRDOVA-MURUETA, J.H., 2011. Comparison of digestive proteinases in three penaeids. *Aquaculture* 317, 99–106.
- FIGUEIRÊDO, M.C.B. de; ARAÚJO, L.F.P. de; ROSA, M.F. de; MORAIS, L.F.S. de; PAULINO, W.D.; GOMES, R.B. Impactos ambientais da carcinicultura de águas interiores. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.11, p.231-240, 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FishStat plus**: universal software for fishery statistical time series. Version 2.3. Rome: FAO, 2012.
- FAO, 2012. The state of world fisheries and aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- <<http://www.fao.org/docrep/016/i2727e/i2727e01.pdf>>.
- FOX, H. M., Anal and oral intake of water by crustacea 1952. Bedford College, University of London 583-599.
- GARCÍA-CARREÑO, F. L., TORO, M. A. N., Fernando L. del, CÓRDOVA-MURUETA, J. H. (2011). Comparison of digestive proteinases in three penaeids. *Aquaculture* 317 99–106.
- GUERRERO, L., GARCIA-CARREÑO, F. & TORO, M. A. (2004). Characterization of Proteases in the Digestive System of Spiny Lobster (*Panulirus interruptus*). *Marine Biotechnology* 6.

- ICELY, J.D., NOTT, J.A., 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. Em: Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol. 10, Decapoda Crustacea, Nova Iorque. Ed. Wiley-Liss, p 147-201.
- LE MOUILLAC, G., KLEIN, B., SELLOS, D., VAN WORMHOUDT, A., 1996. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 208, 107–125.
- LEMOS, D., EZQUERRA, J.M., GARCIA-CARRENO, F.L., 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feeding digestibility. Aquaculture 186, 89–105.
- LI, C., WENG, S., CHEN, Y., YU, X., LU, L., ZHANG, H., HE, J., XU, X. 2012. Analysis of *Litopenaeus vannamei* Transcriptome Using the Next-Generation DNA Sequencing Technique. PLoS ONE 7(10): e47442. doi:10.1371/journal.pone.0047442.
- MARQUES, L. C.; ANDREATTA, E. R. Efeito da salinidade sobre o consumo de ração, crescimento e sobrevivência de juvenis de camarão rosa *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967). In: Simpósio Brasileiro de Aquicultura, 10., 1998, Recife. **Anais...** Recife: ABCC, 1998. p.315-327.
- MARTIN, G. G., SIMCOX, R., NGUYEN, A. & CHILINGARYAN, A. (2006). Peritrophic membrane of the Penaeid Shrimp *Sicyonia ingentis*. *Bio. Bull.* 211, 275–285.
- MCGRAW, W.J.; DAVIS, D.A.; TEICHERT-CODDINGTON, D.; ROUSE, D.B. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction. **Journal of the World Aquaculture Society**, v.33, p.78-84, 2002.
- MUHLIA-ALMAZÁN, A., SÁNCHEZ-PAZ, A. & GARCÍA-CARREÑO, F. L. (2008). Invertebrate trypsins: a review. *Journal of Comparative Physiology B* 178, 655-672.
- OUIFARD, A., SEYFABADI, J., KENARI, A.A., REZAEI, M., 2012. Growth and apparent digestibility of nutrients, fatty acids and amino acids in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with rice protein concentrate as total and partial replacement of fish meal. *Aquaculture* 342-343, 56–61.
- PERERA, E., MOYANO, F. J., DÍAZ, M., PERDOMO-MORALES, R., MONTERO-ALEJO, V., ALONSO, E., CARRILLO, O. & GALICH, G. S. (2008). Polymorphism and partial characterization of digestive enzymes in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Comparative Biochemistry*

and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 150, 247-254.

PERERA, E., RODRÍGUEZ-VIERA, L., RODRÍGUEZ-CASARIEGO, J., FRAGA, I., CARRILLO, O., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G., MANCERA, J. M. 2012. Dietary protein quality differentially regulates trypsin enzymes at the secretion and transcription level in *Panulirus argus* by distinct signaling pathways. The Journal of Experimental Biology 215, 853-862.

ROJAS, E.; ALFARO, J. In vitro manipulation of egg activation in the open thelycum shrimp *Litopenaeus*. **Aquaculture**, v.264, p.469-474, 2007.

SAINZ, J. C., GARCÍA-CARREÑO, F., HERNÁNDEZ-CORTÉS, P. 2004a. *Penaeus vannamei* isotrypsins: purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 138:155–162

SAINZ, J. C., GARCÍA-CARREÑO, F., SIERRA-BELTRÁN, A., HERNÁNDEZ-CORTÉS, P. 2004b. Trypsin synthesis and storage as zymogen in the midgut gland of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Crustacean Biology, 24(2):266-273.

SAINZ, J., GARCÍACARRENO, F., CORDOVAMURUETA, J. & CRUZHERNANDEZ, P. (2005). Whiteleg shrimp (Boone, 1931) isotrypsins: Their genotype and modulation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 326, 105-113.

SAINZ-HERNÁNDEZ, J.C., MURUETA, J.H.C., 2009. Activity of trypsin from *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 290, 190–195.

SELLOS, D., VAN WORMHOUDT, A., 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Lett.* 309, 219–224.

SAMOCHA, T.M.; HAMPER, L.; EMBERSON, C.R.; DAVIS, A.D.; MCINTOSH, D.; LAWRENCE, A.L.; VAN WYK, P.M. Review of some recent developments in sustainable shrimp farming practices in Texas, Arizona, and Florida. **Journal of Applied Aquaculture**, v.12, p.1-30, 2002.

SIMMONS, T., MOZO, J., WILSON, J., AHEARN, G. A. 2012 Cation-dependent nutrient transport in shrimp digestive tract. *J Comp Physiol B* 182:209–216.

SRIPHAJIT, T., FLEGEL, T. W. & SENAPIN, S. (2007). Characterization of a shrimp serine protease homolog, a binding protein of yellow head virus. *Developmental & Comparative Immunology* 31, 1145-1158.

- STEPHENS, A., ROJO, L., ARAUJO-BERNAL, S., GARCIA-CARREÑO, F., MUHLIA-ALMAZAN, A. (2012). Cathepsin B from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence analysis, tissues-specific expression and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 161, 32–40.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C., BIANCHI, A.G., 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo-and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.* 25, 487-494.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 109, 1 – 62.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C., JORDÃO, B. P., & DILLON, R. J. (1996). Digestive enzymes. In M. J. Lehane, & P. F. Billingsley (Eds.), *Biology of the Insect Midgut* (pp. 153 – 194). London, UK: Chapman and Hall.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 47, 47 – 61.
- TERRA, W. R., & FERREIRA, C. (2005). Biochemistry of digestion. In L. I. Gilbert, K. Iatrou , & S. S. Gill (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science, Vol. 4, Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 171 – 224). Oxford, UK : Elsevier.
- TERRA, W. R., FERREIRA, C. (2010). Digestive system. In V. H. Resh, & R. T. Cardé (Eds.), *Encyclopedia of Insects* (2nd edn, pp. 273 – 281). San Diego, CA: Academic Press.
- WANG, L., LI, F., WANG, B., XIANG, J., 2012. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 33, 1285-1291.
- XU, W.J., PAN, L.Q., SUN, X.H., HUANG, J., 2012. Effects of bioflocs on water quality, and survival, growth and digestive enzyme activities of *Litopenaeus vannamei* (Boone) in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture Research*, 1-10.
- XU, W-J., PAN, L-Q., 2012. Effects of bioflocs on growth performance, digestive enzyme activity and body composition of juvenile *Litopenaeus vannamei* in zero-water exchange tanks manipulating C/N ratio in feed. *Aquaculture* 356-357, 147–152.
- YUAN, Y.-C., GONG, S.-Y., YANG, H.-J., LIN, Y.-C., YU, D.-H. & LUO, Z. (2010). Apparent digestibility of selected feed ingredients for Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Aquaculture* 306, 238-243.

ZHONG, W., ZHANG, S., LI, J., HUANG, W., WANG, A. (2011)
Effects of dietary replacement of fish oil by conjugated linoleic acid on
some meat quality traits of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*.
Food Chemistry 127. 1739–1743